



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΜΠΟΜΠΑΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2022

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ
ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ**

**BIOCHEMICAL STUDIES ON THE HUMAN
BRAIN GLYCOGEN PHOSPHORYLASE**

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΑΣΗ ΤΟΥ ΓΛΥΚΟΓΟΝΟΥ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΕΓΚΕΦΑΛΟ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ: ΜΠΟΜΠΑΣ ΧΑΡΑΛΑΠΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ Δ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Δ. ΛΕΩΝΙΔΑΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΣΚΑΜΝΑΚΗ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ–ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ANNA-MARIA ΨΑΡΡΑ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1 Γλυκογόνο	8
1.2 Δομή του γλυκογόνου.....	8
1.3 Μεταβολισμός του γλυκογόνου	9
1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου	12
1.5 Σημασία 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (PLP)	14
1.6 Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου	15
1.7 Ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου.....	17
1.7.1 Καταλυτικό κέντρο.....	18
1.7.2 Κέντρο αναστολής	19
1.7.3 Κέντρο σύνδεσης κερσετίνης.....	19
1.7.4 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου	21
1.7.5 Αλλοστερικό κέντρο	21
1.7.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο	22
1.8 Διεπαφή υπομονάδων των GP	22
1.8.1 Το λειτουργικό διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου	23
1.8.2 Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου	24
1.8.3 Ο πυρήνας των ελίκων πύργων	25
1.9 Εντοπισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο	25
1.10 Ρόλος του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα	26
1.11 Μεταβολισμός γλυκογόνου στον εγκέφαλο	27
1.12 Επιπτώσεις διαταραχής μεταβολισμού της γλυκόζης στον εγκέφαλο	29
1.13 Προοδευτική μυοκλονική επιληψία MELF (ασθένεια Lafora)	29
1.14 Νόσος Alzheimer	31
2. Σκοπός.....	33
3. Πειραματικό μέρος	34
3.1 Υλικά.....	34
3.1.1 Αντιδραστήρια	34
3.1.2 Όργανα.....	35

3.1.3 Βακτηριακά Στελέχη	36
3.1.4 Στήλες χρωματογραφίας	36
3.2 Θρεπτικά μέσα.....	37
3.3 Μέθοδοι.....	37
3.3.1 Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i>	37
3.3.1.1 Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> (<i>BL21 Gold (DE3)</i> , <i>OverExpress C41 (DE3)</i> , <i>OverExpress C43 (DE3)</i>) με την χημική μέθοδο	38
3.3.1.2 Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> (<i>BL21 Gold (DE3)</i> , <i>OverExpress C41 (DE3)</i> , <i>OverExpress C43 (DE3)</i>) με θερμικό σοκ.	39
3.3.2.1 Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> (<i>BL21 Gold (DE3)</i> , <i>OverExpress C41 (DE3)</i> , <i>OverExpress C43 (DE3)</i>) με ηλεκτροδιάτρηση.	40
3.3.2.2 Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων <i>E. coli</i> (<i>BL21 Gold (DE3)</i> , <i>OverExpress C41 (DE3)</i> , <i>OverExpress C43 (DE3)</i>) με ηλεκτροδιάτρηση.....	41
3.3.3 Δοκιμές έκφρασης της εγκεφαλικής ισομορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (<i>HbGP</i>) παρουσία μοριακών συνοδών	41
3.3.4 Χρωματογραφία	47
3.3.4.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (<i>FPLC</i>).....	47
3.3.4.2 Αρχή της μεθόδου.....	47
3.3.4.3 Χρωματογραφία συγγένειας (<i>affinity chromatography</i>)	49
3.3.4.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)	50
3.3.5 Απομόνωση και καθαρισμός φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (<i>HbGP</i>).....	50
3.3.6 Φωσφορυλίωση <i>HbGP</i>	54
3.3.7 Υπολογισμός σταθεράς <i>Michaelis-Menten</i> (K_m).....	55
3.3.8 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας	56
3.3.9 Μέθοδος ασκορβικού οξέος.....	56
3.3.10 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα.....	57
3.3.11 Ανάλυση κινητικών δεδομένων.....	58
4. Αποτελέσματα	60
4.1 Δοκιμές έκφρασης της <i>HbGP</i> παρουσία μοριακών συνοδών	60
4.2 Απομόνωση <i>HbGP</i>	67
4.3 Κινητικές μελέτες.....	70
5. Συζήτηση	74
6. Βιβλιογραφία	76
7. Παράτημα	85

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Σεπτέμβριο του 2020 έως τον Μάρτιο του 2021, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημήτριου Λεωνίδα. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από καρδιάς για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του, βελτιώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο σημαντικά το επιστημονικό μου υπόβαθρο, αλλά και για την εμπιστοσύνη και την κατανόησή του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την αμέριστη βοήθεια σε κάθε λογής πρόβλημα που μου δημιουργήθηκε κατά τη διάρκεια αυτής, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές τους. Επίσης ευχαριστώ τον καθηγητή *Fernando Rodrigues-Lima* για την παροχή του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την *HbGP*.

Θα μου ήταν αδύνατο να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Πιο συγκεκριμένα, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο για όλες τις ανεκτίμητες συμβουλές, τη στήριξη, τη βοήθεια και την υπομονή που επέδειξε καθ' όλη την διάρκεια της συνεργασίας μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Δράκου Χριστίνα και τους υποψήφιους διδάκτορες Κούλα Συμεών, Παπαϊωάννου Όλγα, Σολοβού Θεοδώρα, Τσαγκαράκου Αναστασία για το υπέροχο κλίμα που δημιούργησαν στο εργαστήριο.

Τελευταίους και καλύτερους άφησα τα μέλη της οικογενείας μου, τη μητέρα μου και τον αδερφό μου από τους οποίους εισέπραξα απεριόριστη αγάπη και στήριξη. Με την πίστη και τη βοήθειά τους πιστεύω πραγματικά ότι μπορώ να πετύχω όλους τους στόχους μου. Δεν υπάρχουν λέξεις που να μπορούν να περιγράψουν την αγάπη και την ευγνωμοσύνη που νιώθω για αυτούς.

Περίληψη

Το γλυκογόνο είναι η αποθήκη γλυκόζης των κυττάρων όπου ανάλογα με τον ιστό που εντοπίζεται υπηρετεί διαφορετικές λειτουργίες. Στους μυς παρέχει ενέργεια μέσω του μονοπατιού της γλυκόλυσης για τη συστολή των σκελετικών μυών. Στο ήπαρ μεταβολίζεται για την απελευθέρωση γλυκόζης στη συστηματική κυκλοφορία σε περιόδους νηστείας. Στον εγκέφαλο θεωρείται πηγή ενέργειας σε καταστάσεις έκτακτης ανάγκης. Οι βασικοί ρόλοι που παίζει το γλυκογόνο του εγκεφάλου και ο μεταβολισμός του στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών έχουν μελετηθεί τα τελευταία 20 χρόνια. Για παράδειγμα, η λειτουργία των αστροκυττάρων και η νευρωνική δραστηριότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα αποθέματα γλυκογόνου, ειδικά κατά τη διάρκεια επεισοδίων στρες που περιλαμβάνουν υπογλυκαιμία και ισχαιμία. Η διάσπαση αστροκυτταρικού γλυκογόνου και η επακόλουθη μεταφορά γαλακτικού οξέος ανάμεσα στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες έχουν προταθεί για την υποστήριξη υψηλών γνωστικών διεργασιών όπως η μάθηση και η εμπέδωση μνήμης. Επιπλέον, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στους νευρώνες συμμετέχει στην επιβίωση των νευρώνων στο υποξικό στρες. Αλλοίωση του μεταβολισμού του γλυκογόνου και υπερσυσσώρευση του στον εγκέφαλο μαζί με άλλα πολυμερή α-, β- γλυκανών συμβάλλει στο νευροεκφυλισμό. Το ένζυμο κλειδί στο μεταβολισμό του είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP EC 2.4.1.1*) η οποία είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση καταλοίπων γλυκόζης από αυτό. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου που εκφράζεται στον ανθρώπινο εγκέφαλο προκειμένου να γίνει κατανοητή η συμπεριφορά της συγκεκριμένης ισομορφής του ενζύμου.

Λέξεις κλειδιά: φωσφορυλάση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες, νόσος *Alzheimer*

Abstract

Glycogen is the glucose storehouse of cells serving various tasks depending on the tissue in which is located. It provides energy to muscles through the glycolysis pathway for skeletal muscle contraction. In the liver, it is metabolized for the release of glucose into the systemic circulation during periods of fasting, whereas in the brain it is considered a source of energy in emergencies. The main roles played by brain glycogen and its metabolism in the mammalian nervous system have been studied for the last 20 years. For example, astrocyte function and neuronal activity are highly dependent on glycogen stores, especially during stressful episodes that include hypoglycemia and ischemia. The breakdown of astrocytic glycogen and the subsequent transfer of lactic acid between astrocytes and neurons have been suggested to support highly cognitive processes such as learning and memory consolidation. In addition, glycogen metabolism in neurons is involved in neuronal survival in hypoxic stress. Alteration of its metabolism and its over-accumulation in the brain along with other α -, β - glucans contributes to neurodegeneration. The key enzyme in its metabolism is glycogen phosphorylase (GP EC 2.4.1.1) which is responsible for releasing glucose residues. In this thesis, human brain glycogen phosphorylase was biochemically characterized to provide data for the activity of the specific enzymic isoform in the brain.

Key-words: phosphorylase, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease

1. Εισαγωγή

1.1 Γλυκογόνο

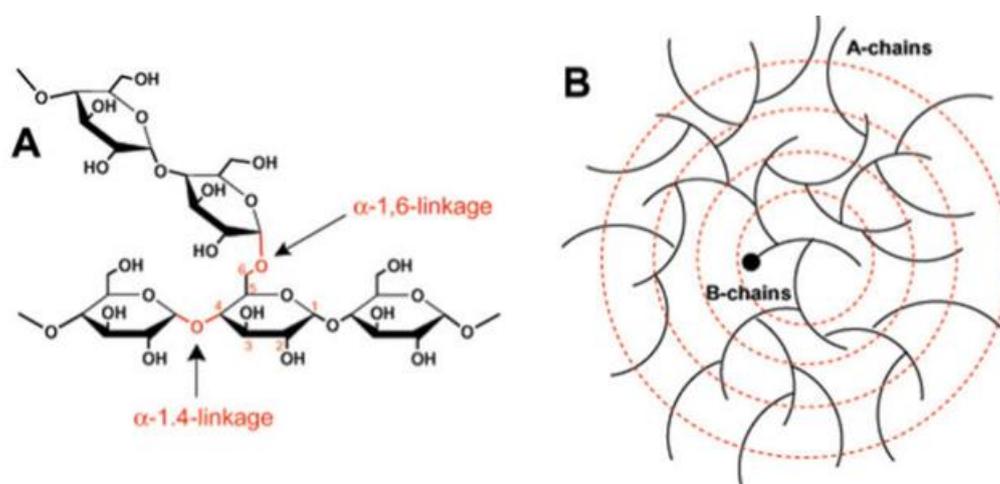
Το γλυκογόνο είναι ένα ωσμωτικά ουδέτερο διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης το οποίο λειτουργεί ως αποθήκη γλυκόζης στα κύτταρα, σε περιόδους διατροφικής ευημερίας για την μετέπειτα χρήση του σε περιπτώσεις που είναι αναγκαία η ενέργεια που περιέχεται σε αυτό [1]. Είναι παρόν σε πληθώρα οργανισμών από βακτήρια και αρχαία μέχρι και τον άνθρωπο, ενώ τα φυτά συνθέτουν παρόμοια με το γλυκογόνο πολυμερή γλυκόζης, τα οποία βρίσκονται με τη μορφή αμύλου. Το άμυλο με την σειρά του αποτελείται από την αμυλοπεκτίνη, ένα πολυσακχαρίτη χημικά παρόμοιο με το γλυκογόνο και την αμυλόζη, που αποτελεί ένα μη-διακλαδισμένο γραμμικό πολυμερές γλυκόζης [2, 3]. Για τους παραπάνω λόγους είναι κατανοητό ότι ο πολυμερισμός της γλυκόζης μπορεί να θεωρηθεί πως αποτελεί ένα καθολικό μηχανισμό αποθήκευσης ενέργειας στην φύση [4].

1.2 Δομή του γλυκογόνου

Τα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με δύο είδη γλυκοζιτικών δεσμών. Ο πρώτος είναι ο α -1,4-γλυκοζιτικός δεσμός, όπου δύο διαδοχικά κατάλοιπα γλυκόζης συνδέονται γραμμικά μεταξύ τους, ενώ ο δεύτερος είναι ο α -1,6-γλυκοζιτικός δεσμός όπου συνδέονται μεταξύ τους τα διακλαδισμένα μόρια, ενώ οι διακλαδώσεις συναντώνται περίπου ανά δέκα μόρια γλυκόζης [5, 6]. Το κάθε μόριο γλυκογόνου θεωρητικά αποτελείται από περίπου 55.000 κατάλοιπα γλυκόζης και η διάμετρός του ανέρχεται περίπου σε 44 *nm* με μοριακό βάρος περίπου 10^7 *KDa* [7]. Όσον αφορά την οργάνωση των καταλοίπων γλυκόζης στην δομή του γλυκογόνου διακρίνονται δύο ειδών αλυσίδες: οι εσωτερικές Β-αλυσίδες, που συνήθως φέρουν δύο σημεία διακλάδωσης και οι εξωτερικές Α-αλυσίδες, που είναι ελεύθερες διακλαδώσεων [5, 8-10].

Παρόλο που το γλυκογόνο αποτελείται κατά κόρον από γλυκόζη, ευρήματα έχουν δείξει και την παρουσία άλλων παραγόντων με πιο κύριους τη γλυκοζαμίνη και τα φωσφορικά [11, 12]. Η καλύτερα μελετημένη περίπτωση είναι αυτή της

ομοιοπολικής σύνδεσης των φωσφορικών. Για πολλά χρόνια η παρουσία τους στο γλυκογόνο θεωρούνταν ότι οφείλεται σε τυχόν επιμολύνσεις που προέκυπταν στην απομόνωση του μορίου, ωστόσο χρόνια αργότερα (περίπου το 1980) κάποια ευρήματα αποκάλυψαν ότι έχει λειτουργικό ρόλο [13]. Αρχικά έγινε η υπόθεση ότι τα φωσφορικά συναντώνται στο γλυκογόνο ως μονοεστέρες στον C₆, αποκλείοντας με αυτόν τον τρόπο τον σχηματισμό πιθανών σημείων διακλάδωσης και ως φωσφοδιεστέρες μεταξύ των C₁-C₆, παρουσιάζοντας ένα εναλλακτικό σημείο διακλάδωσης. Ωστόσο μεταγενέστερες μελέτες σε φωσφο-ολιγοσακχαρίτες που απομονώθηκαν από γλυκογόνο μυών κονίκλων με τις μεθόδους φασματοσκοπίας μάζας και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού κατέδειξαν ότι τα φωσφορικά εντοπίζονται στους C₂ και C₃ γεγονός που αποδόθηκε σε μη ειδικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την σύνθεσή του από τη συνθάση του γλυκογόνου [14].

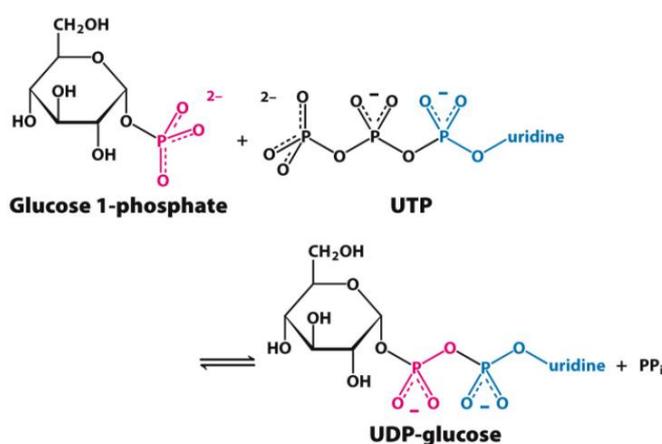


Εικόνα 1.2.α: A: Απεικόνιση δεσμών ανάμεσα στα μόρια της γλυκόζης στο γλυκογόνο. B: Η οργάνωση των αλυσίδων γλυκόζης [4].

1.3 Μεταβολισμός του γλυκογόνου

Οι κύριες αποθήκες γλυκόζης στα θηλαστικά εντοπίζονται στο μυϊκό ιστό (σκελετικοί μύες) και στο ήπαρ. Πληθώρα όμως και άλλων οργάνων όπως η καρδιά, οι νεφροί, ο εγκέφαλος, ο λιπώδης ιστός έχουν την ικανότητα να συνθέτουν γλυκογόνο. Το απαραίτητο μόριο για τη σύνθεση του γλυκογόνου, είναι αφενός η γλυκόζη, η οποία προκύπτει είτε από πρόσφατη πρόσληψη υδατανθράκων (άμεσο μονοπάτι), είτε από μία άλλη διαδικασία τη “γλυκονεογένεση” ή “έμμεσο μονοπάτι” από πρόδρομα μόρια όπως το γαλακτικό και η αλανίνη [15].

Στο άμεσο μονοπάτι η είσοδος της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων μεσολαβεί με μέσω ενός ή περισσότερων μεταφορέων γλυκόζης (*GLUTs*, *Glucose Transporter*) [16]. Ο *GLUT1* είναι ευρέως κατανοημένος και παρέχει τη βασική κάλυψη για την είσοδο της γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων, ο *GLUT4* είναι απαραίτητος σε ιστούς που δέχονται σηματοδότηση από την ινσουλίνη όπως: οι σκελετικοί μύες και ο λιπώδης ιστός, ενώ ο *GLUT2* εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ καθώς και στα β-κύτταρα του παγκρέατος όπου και η γλυκόζη εισέρχεται εφόσον το επιτρέπει η βαθμίδωση της συγκέντρωσής της ανάμεσα στα κύτταρα αυτά και την κυκλοφορία του αίματος [16, 17].



Εικόνα 1.3.α: Πορεία σχηματισμού *UDP*-γλυκόζης [6].

Στη βιοσύνθεση του γλυκογόνου δότης γλυκόζης είναι η ουριδινο-διφωσφορική γλυκόζη (*UDP*-γλυκόζη) που αποτελεί μία ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης. Ο άνθρακας C_1 της γλυκοζυλικής μονάδας είναι ενεργοποιημένος καθώς το υδροξύλιό του είναι εστεροποιημένο με μία μονάδα διφωσφορικού της διφωσφορικής ουριδίνης (*UDP*). Η *UDP*-γλυκόζη συντίθεται από την 1-φωσφορική γλυκόζη και την τριφωσφορική ουριδίνη (*UTP*) σε μία αντίδραση η οποία καταλύεται από την πυροφωσφορυλάση της *UDP*-γλυκόζης. Σε αυτήν την αντίδραση τα δύο εξωτερικά φωσφορικά κατάλοιπα της *UTP* απελευθερώνονται ως πυροφωσφορικό ιόν [6]. Η ενεργοποιημένη γλυκοζυλική μονάδα της *UDP*-γλυκόζης μεταφέρεται στο υδροξύλιο του άνθρακα C_4 ενός καταλοίπου του γλυκογόνου προς τον σχηματισμό ενός α-1,4-γλυκοσιδικού δεσμού ενώ η *UDP* αντικαθίσταται από την υδροξυλική ομάδα του αυξανόμενου μορίου του γλυκογόνου, μία αντίδραση η οποία καταλύεται από την συνθάση του γλυκογόνου (*GYS*) [6, 18].

Για να μπορέσει να λειτουργήσει η συνθάση του γλυκογόνου και να προσθέσει κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο απαιτεί την ύπαρξη τεσσάρων ή περισσότερων καταλοίπων γλυκόζης στην πολυσακχαρική αλυσίδα. Τον ρόλο του εκκινήτη διαδραματίζει μία άλλη πρωτεΐνη, η γλυκογενίνη. Η γλυκογενίνη είναι μία γλυκοζυλο-μεταφοράση που έχει τη δυνατότητα αυτο-γλυκοζυλίωσης, για το σχηματισμό βραχέων πολυμερών γλυκόζης μήκους περίπου 10-20 καταλοίπων, επιτρέποντας έτσι στη συνθάση του γλυκογόνου να επεκτείνει το μόριο του γλυκογόνου [6, 19-22].

Το ένζυμο το οποίο απαιτείται για το σχηματισμό α-1,6-γλυκοσιδικών δεσμών που συναντώνται στο γλυκογόνο καλείται ένζυμο σχηματισμού διακλαδώσεων (*GBE*) και μεταφέρει μία ομάδα επτά ή περισσότερων καταλοίπων γλυκόζης σε μία πιο εσωτερική θέση. Απαραίτητες προϋποθέσεις για τον επιτυχή σχηματισμό διακλαδώσεων είναι η ύπαρξη μη αναγωγικού άκρου στην ομάδα καταλοίπων που θα μεταφερθεί στο σημείο διακλάδωσης, ενώ η αλυσίδα που μεταφέρεται θα πρέπει να προέρχεται από μία άλλη αλυσίδα τουλάχιστον έντεκα καταλοίπων και το σημείο διακλάδωσης να απέχει τουλάχιστον τέσσερα κατάλοιπα από ένα προϋπάρχον. Ο σχηματισμός των διακλαδώσεων είναι αρκετά σημαντική διαδικασία, καθώς με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η διαλυτότητα του γλυκογόνου και επίσης δημιουργούνται πολλαπλές θέσεις αποδόμησής του (*GDE*) [6].

Για τους περισσότερους ιστούς το γλυκογόνο αποτελεί πηγή 6-φωσφορικής γλυκόζης (*G6P*) μέσω της οποίας τροφοδοτείται ο κύκλος της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας. Στο ήπαρ στο οποίο αποθηκεύεται και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (100-500 $\mu\text{mol/g}$) είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Στους μύες (30-100 $\mu\text{mol/g}$) διασπάται για την προσφορά ενέργειας που είναι απαραίτητη κατά την διάρκεια της σωματικής άσκησης ενώ στον εγκέφαλο (0,5-1,5 $\mu\text{mol/g}$) φαίνεται να έχει κυρίως προστατευτικό ρόλο σε περιπτώσεις όπως τα ισχαιμικά επεισόδια, η εξαντλητική σωματική άσκηση που μπορεί να προκαλέσει υπογλυκαιμία καθώς και σε επιληπτικές κρίσεις [23, 24]. Ωστόσο όσον αφορά το γλυκογόνο του εγκεφάλου φαίνεται να εμπλέκεται και σε φυσιολογικές διεργασίες, όπως ο σχηματισμός της μνήμης, η αισθητηριακή διέγερση και η φυσιολογική εναλλαγή ανάμεσα στο κερκάδιο ρολόι [23].

Τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη διάσπαση του γλυκογόνου (γλυκογονόλυση) είναι η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*GP*) και το ένζυμο αποδιακλάδωσης (*GDE*). Με την δράση αυτών των δύο ενζύμων προκύπτει 1-φωσφορική γλυκόζη (*G1P*) η οποία ισομερίζεται από τη φωσφογλυκομουτάση (*PGM*) προς 6-φωσφορική γλυκόζη (*G6P*). Τελικά, η 6-φωσφορική γλυκόζη (*G6P*) μεταφέρεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου και υδρολύεται [25].

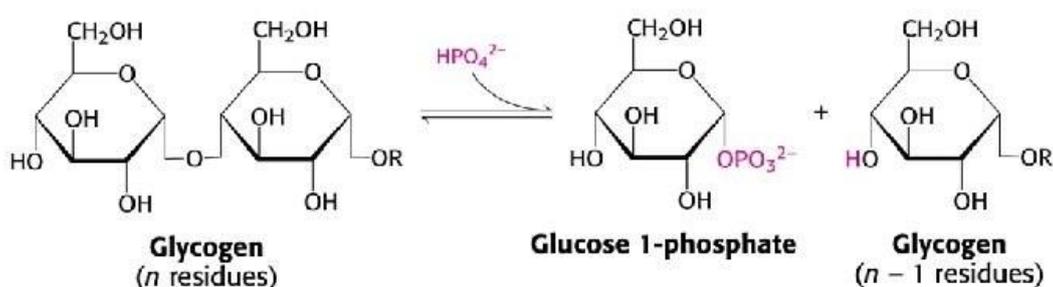
1.4 Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου (*Glycogen Phosphorylase*) (*GP*, EC 2.4.1.1) είναι ένα ένζυμο κλειδί στην αποικοδόμηση του γλυκογόνου. Κατέχει μια ξεχωριστή θέση στην ιστορία της βιοχημείας, αφού μελέτες της συνέβαλαν στην ανακάλυψη της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης και της αλλοστερικής ρύθμισης [26]. Στον άνθρωπο εκφράζονται τρεις διαφορετικές ισομορφές της *GP*. Η ονομασία τους προκύπτει από τον ιστό στον οποίον εμφανίζονται σε μεγαλύτερη ποσότητα χωρίς να σημαίνει ότι δεν συναντώνται σε άλλους ιστούς. Οι τρεις αυτές ισομορφές είναι: η ηπατική *GP* που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PYGL* (846 α.α.), η μυϊκή *GP* που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PYGM* (841 α.α.) και η εγκεφαλική *GP* που κωδικοποιείται από το γονίδιο *PYGB* (862 α.α.). Έχει παρατηρηθεί ότι οι ισομορφές είναι ταυτόσημες μεταξύ τους κατά 80%, ενώ παράλληλα η ταυτοσιμότητά τους με τις ίδιες ισομορφές άλλων οργανισμών (π.χ. τρωκτικά) ανέρχεται περίπου στο 97% [26, 27].

Η *GP* διασπά το υπόστρωμά της (γλυκογόνο) μέσω μίας αντίδρασης φωσφορόλυσης. Παρουσία ορθοφωσφορικών ιόντων (*Pi*) και της δράσης της *GP* απελευθερώνεται από το γλυκογόνο ένα μόριο *G1P*. Πιο συγκεκριμένα η *GP* καταλύει τη διαδοχική απομάκρυνση καταλοίπων γλυκόζης από τα μη αναγωγικά άκρα του γλυκογόνου (άκρα με ελεύθερη υδροξυλομάδα στον C_4 άνθρακα). Το ορθοφωσφορικό ιόν προσβάλλει τον α-1,4-γλυκοζιτικό δεσμό και έτσι το μόριο που προκύπτει είναι μία φωσφορυλιωμένη γλυκόζη (*G1P*). Η *GP* συνεχίζει τη δράση της μέχρι να φτάσει στο τέταρτο κατάλοιπο γλυκόζης από ένα σημείο διακλάδωσης. Για να συνεχίσει τη δράση της θα πρέπει να μεσολαβήσουν δύο ένζυμα, μία α-1,6-γλυκοζιτάση και μία μεταφοράση. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς οι λειτουργίες αυτές καταλύονται από ένα διλειτουργικό ένζυμο, το ένζυμο αποδιακλάδωσης του γλυκογόνου (*GDE*).

Το ένζυμο αυτό λειτουργεί μεταφέροντας τρία διαδοχικά κατάλοιπα γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους από μία εξωτερική διακλάδωση σε μία άλλη (δράση μεταφοράς) με αποτέλεσμα να περισσεύει μόνο το κατάλοιπο γλυκόζης το οποίο είναι συνδεδεμένο με α -1,6-γλυκοζιτικό δεσμό, το οποίο και στη συνέχεια απελευθερώνεται (δράση α -1,6-γλυκοζιτάσης) [6].

Η αντίδραση της φωσφορόλυσης μέσω της *GP* είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση. Σε pH 6.8, ο λόγος ισορροπίας $[Pi]/[G1P]$ είναι 3.6, ωστόσο *in vivo* ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος του εκατό πράγμα το οποίο σημαίνει ότι ευνοείται αποκλειστικά η φωσφορόλυση [28].



Εικόνα 1.4.α: Διάσπαση γλυκογόνου από την *GP* (επεξεργασμένη [6]).

Η *GP* είναι ένα αλλοστερικό ένζυμο το οποίο ακολουθεί το προτεινόμενο μοντέλο MWC (*Monod, Wyman & Changeaux*) [29]. Συναντάται σε δύο αλληλομετατρέπόμενες διαμορφώσεις, την *R* (*relaxed*) και την *T* (*tense*). Στην *R* διαμόρφωσή της η *GP* παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους τροποποιητές της ενώ αντίθετα στην *T* παρουσιάζει χαμηλή συγγένεια για τα υποστρώματα και τους τροποποιητές της. Οι δύο αυτές διαμορφώσεις βρίσκονται πάντοτε σε ισορροπία [30]. Η κύρια ισομορφή της *GP*, η ηπατική, εντοπίζεται αφενός στο ήπαρ, ενώ μετέπειτα μελέτες αποδεικνύουν την έκφρασή της σε όλους τους ιστούς εκτός του εγκεφάλου, των σκελετικών και των καρδιακών μυών, και είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης. Από την άλλη πλευρά, η μυϊκή και η εγκεφαλική *GP* μεταπίπτουν από τη στερεοδιαμόρφωση *T* στην *R* παρουσία του αλλοστερικού τροποποιητή *AMP* προκειμένου η πρώτη να τροφοδοτήσει με ενέργεια τους συσπώμενους μύες ενώ η δεύτερη να παρέχει ενέργεια στους νευρώνες [30, 31].

Εξωκυτταρικά ερεθίσματα (ορμόνες) είναι σε θέση να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν τη *GP*. Η κύρια τροποποίηση που υφίσταται η *GP* είναι η φωσφορυλίωση, μία αντιστρεπτή διαδικασία που πραγματοποιείται μέσω της κινάσης της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*PhK*). Η *PhK* φωσφορυλιώνει την ανενεργή *GP(b)* σε *GP(a)* στη σερίνη-14 (*Ser₁₄*) ενεργοποιώντας την, ενώ η αντίστροφη πορεία, η αποφωσφορυλίωση της *Ser₁₄* της *GP*, πραγματοποιείται μέσω της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 1 (*PP1*) [32-34]. Η συγγένεια της *GP(a)* για το *AMP* είναι περίπου εκατό φορές μεγαλύτερη από εκείνη της *GP(b)*, ενώ αντίθετα είναι μικρότερη για τις *ATP*, *ADP*, *G6P* [35, 36]. Σε συνθήκες παρουσίας περίσσειας γλυκόζης αφού αυτή συνδεθεί στην *GP(a)* προκαλεί μετάπτωση της *GP* από την *R* μορφή στην *T*, με αποτέλεσμα την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του ενζύμου η οποία τη καθιστά καλύτερο υπόστρωμα για την *PP1*, η οποία με την σειρά της θα αποφωσφορυλιώσει και θα απενεργοποιήσει το ένζυμο [27].

Η κάθε ισομορφή της *GP* φαίνεται να παρουσιάζει διαφορετικό βαθμό απόκρισης στον τρόπο ενεργοποίησης. Η ηπατική ισομορφή είναι πιο ευαίσθητη στη φωσφορυλίωση της *Ser₁₄*, η μυϊκή ενεργοποιείται συνεργατικά από φωσφορυλίωση της *Ser₁₄* αλλά για να αποκτήσει τη μέγιστη δραστηριότητά της απαιτεί και τη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή *AMP*, ενώ η εγκεφαλική αποκρίνεται κυρίως στη σύνδεση του αλλοστερικού τροποποιητή *AMP* [31]. Η εγκεφαλική ισομορφή διαθέτει επτά φορές μικρότερη σταθερά *K_a* (συγκέντρωση της *AMP* που απαιτείται για να επιτευχθεί το ήμισυ της μέγιστης δραστηριότητας που παρουσιάζεται σε περίσσεια *AMP*) σε σχέση με τη μυϊκή που σημαίνει πως η εγκεφαλική ισομορφή ενδογενώς έχει διαμόρφωση που παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για την *AMP*, ανάλογη με αυτή που λαμβάνει η μυϊκή παρουσία 1 mol *AMP* σε κάθε λειτουργικό διμερές [30, 37, 38]. Η δραστηριότητα της ισομορφής του εγκεφάλου φαίνεται να μην επηρεάζεται από τη φωσφορυλίωση της *Ser₁₄* [30]. Οι παραλλαγές στην ενεργοποίηση των διαφορετικών ισομορφών της *GP* αντικατοπτρίζουν και το διαφορετικό τους ρόλο.

1.5 Σημασία 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (*PLP*)

Η φωσφορολυτική διάσπαση του γλυκογόνου πλεονεκτεί ενεργειακά, καθώς το σάκχαρο το οποίο απελευθερώνεται είναι ήδη φωσφορυλιωμένο (*G1P*). Με αυτόν

τον τρόπο αποτρέπεται η σπατάλη ενέργειας, καθώς η απελευθέρωση ενός μη φωσφορυλιωμένου καταλοίπου γλυκόζης θα απαιτούσε τη φωσφορυλίωσή του, με αποτέλεσμα τη δαπάνη της *ATP* προκειμένου το μόριο της γλυκόζης να εισέλθει στον γλυκολυτικό κύκλο. Για να μπορέσει να το επιτύχει αυτό η *GP* θα πρέπει να αποκλείσει ένα μόριο ύδατος από το ενεργό της κέντρο. Παρατηρώντας τόσο το υπόστρωμα της *GP* όσο και το κατάλοιπο *G1P* που απελευθερώνεται, βλέπουμε ότι και τα δύο μόρια έχουν διαμόρφωση α στον άνθρακα *C1*. Έτσι, σε συνδυασμό μάλιστα και με την απαίτηση της 5'-φωσφορικής πυριδοξάλης (*PLP*) που αποτελεί παράγωγο της πυριδοξίνης (βιταμίνη B_6), συμπεραίνουμε ότι απαιτείται άρτιος αριθμός βημάτων (συνήθως δύο) στη διαδικασία της φωσφορόλυσης με το πιθανότερο ενδεχόμενο να είναι ένα ενδιάμεσο καρβοκατιόν. Μια βάση *Schiff* σχηματίζεται ανάμεσα στην πλευρική αλυσίδα της λυσίνης-680 (*Lys*₆₈₀) της *GP* και της αλδεϋδικής ομάδας του συνενζύμου αυτού. Δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι μεταξύ της 5'-φωσφορικής ομάδας της *PLP* και του υποστρώματος του γλυκογόνου μεσολαβεί η αντιδρώσα ορθοφωσφορική ομάδα. Η 5'-φωσφορική ομάδα της *PLP* σε συνδυασμό με την ορθοφωσφορική ομάδα λειτουργούν ως δότης και δέκτης πρωτονίων (δηλαδή ως ένα γενικός οξεοβασικός καταλύτης). Το ορθοφωσφορικό ιόν προσφέρει ένα πρωτόνιο στο τέταρτο οξυγόνο της αποχωρούσας αλυσίδας του γλυκογόνου ενώ συγχρόνως αποκτά ένα πρωτόνιο από την *PLP*. Το ορθοφωσφορικό ανιόν προσβάλλει το ενδιάμεσο καρβοκατιόν που προκύπτει οδηγώντας στον σχηματισμό της α -1-φωσφορικής γλυκόζης. Το γεγονός ότι απαιτείται ο αποκλεισμός μορίων ύδατος από το ενεργό κέντρο δικαιολογεί τον ειδικό ρόλο της *PLP* στη διευκόλυνση της φωσφορολυτικής διάσπασης [6].

1.6 Κρυσταλλική δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Γενικά οι τρεις διαφορετικές ισομορφές της *GP*, έχουν παρόμοιες διαμορφώσεις στη τεταρτοταγής τους δομή [31] και πιο συγκεκριμένα συναντώνται συνήθως σε διμερή και τετραμερή. Απουσία *AMP* ή φωσφορυλίωσης τα διμερή παραμένουν στην ανενεργή τους διαμόρφωση. Μετά την ενεργοποίηση τα διμερή αναδιαμορφώνονται επιτρέποντας την μετάπτωση από την ανενεργή *T* αλλοστερική διαμόρφωση στην ενεργή *R*. Η αναδιαμόρφωση των επιφανειών της μυϊκής και της εγκεφαλικής

ισομορφής της *GP* οδηγεί στην απόφραξη του καταλυτικού κέντρου [31, 35, 39]. Η ενεργοποιημένη αλλοστερική *R* διαμόρφωση της ηπατικής ισομορφής της *GP* παραμένει διμερές λόγω της πιο συμπαγούς δομής του. Κάθε μονομερές της *GP* αποτελείται από δύο δομικές επικράτειες:

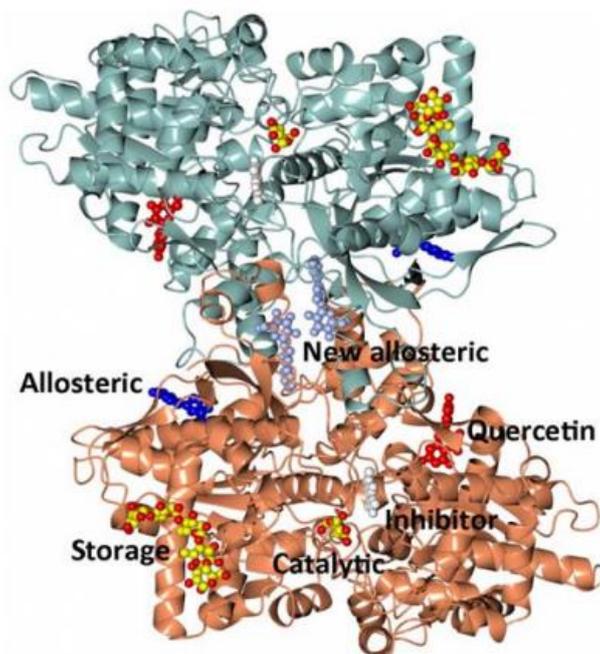
N-τελική επικράτεια: Η επικράτεια αυτή αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 22 έως 484. Περιλαμβάνει τις περιοχές μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν οι υπομονάδες του διμερούς, το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου, το κέντρο της Ser₁₄ και το αλλοστερικό κέντρο ενεργοποίησης της *ATP*.

C-τελική επικράτεια: Η επικράτεια αυτή αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 485 έως 822. Η επικράτεια αυτή περιλαμβάνει τη θέση σύνδεσης του συνενζύμου *PLP* καθώς και ένα τμήμα του ενεργού κέντρου [27, 31, 40]. Υπάρχουν ωστόσο και μέρη της *GP* τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται στις επικράτειες αυτές, αυτά τα μέρη είναι:

- Βρόχος πύλης εισόδου: Αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 285 έως 286
- Βρόχος αδενίνης: Αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 319 έως 324 [31]

Στην *GP* έχουν αναγνωριστεί τα εξής έξι διαφορετικά κέντρα πρόσδεσης:

- Αλλοστερικό κέντρο (δέσμευση *ATP*) [41]
- Καταλυτικό κέντρο (δέσμευση γλυκόζης και *G1P*) [42]
- Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου [43]
- Κέντρο αναστολής (δέσμευση πουρινών και καφεΐνης) [44]
- Νέο αλλοστερικό κέντρο [45]
- Κέντρο πρόσδεσης της κερσετίνης [46]



Εικόνα 1.6.α: Τρισδιάστατη δομή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου-*b* (*GPb*) [47].

1.7 Ρυθμιστικές περιοχές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου

Μέχρι στιγμής η φωσφορυλάση του γλυκογόνου έχει μελετηθεί μόνο ως θεραπευτικός στόχος για το διαβήτη τύπου II [48, 49]. Πράγματι, η αναστολή της ηπατικής φωσφορυλάσης *IGP*, μειώνει την απελευθέρωση της γλυκόζης από το ήπαρ στην κυκλοφορία του αίματος, σταθεροποιώντας τα επίπεδά της στο αίμα. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν οδηγήσει στην ταυτοποίηση κέντρων σύνδεσης μικρών μορίων στο ένζυμο, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητά του. Προσφάτως, ο μεταβολισμός του γλυκογόνου έχει προταθεί ως στόχος για την αντιμετώπιση κάποιων ειδών καρκίνου, λόγω του ότι ο μεταβολισμός του γλυκογόνου μεταβάλλεται στα καρκινικά κύτταρα οδηγώντας σε συσσώρευσή του σε αυτά και επομένως, στην κυτταρική επιβίωση [25]. Πιο συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση του γλυκογόνου στα καρκινικά κύτταρα παρέχει μεταβολίτες, που οδηγούν στην αύξηση των αναγωγικών παραγόντων και νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται από αυτά για τον πολλαπλασιασμό τους αλλά και την επιδιόρθωση τυχόν βλαβών που προκύπτουν στο *DNA*. Συνεπώς η αναστολή του μεταβολισμού του γλυκογόνου σε συνδυασμό με ήδη γνωστούς τρόπους αντιμετώπισης καρκινικών όγκων (παράγοντες που προωθούν βλάβες στο *DNA*,

παράγοντες που ευνοούν την συσσώρευση ROS, αλλά και παράγοντες που αναστέλλουν την λειτουργία των μιτοχονδρίων) μπορεί να αποτελέσει υποσχόμενο τρόπο αντικαρκινικής θεραπείας [50].

Οποιαδήποτε μεταβολή του μεταβολισμού του γλυκογόνου στο εσωτερικό των κυττάρων είναι επιβλαβής και μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες αποθήκευσης του γλυκογόνου [51]. Όσον αφορά τον εγκέφαλο η συσσώρευση του γλυκογόνου στα νευρικά κύτταρα αποδεδειγμένα προκαλεί εκφυλισμό του νευρικού ιστού οδηγώντας σε απώλειά του και ανάπτυξη προοδευτικής μυοκλονικής επιληψίας [52]. Επιπλέον η συσσώρευση μη σωστά διακλαδισμένων πολυσακχαριτών μεταξύ των οποίων και το γλυκογόνο στον εγκέφαλο έχουν παρατηρηθεί και σε άλλες ασθένειες όπως η νόσος *Alzheimer*, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και ο διαβήτης. Για αυτόν τον λόγο η επαγωγή της αποικοδόμησης του συσσωρευμένου γλυκογόνου αλλά και των μη σωστά διακλαδισμένων πολυσακχαριτών στον εγκέφαλο έχει προταθεί ως πιθανή θεραπευτική αντιμετώπιση για ασθένειες του εγκεφάλου [53].

1.7.1 Καταλυτικό κέντρο

Στο κέντρο κάθε υπομονάδας ενός διμερούς τη GP εντοπίζεται το καταλυτικό κέντρο. Παρόλο που βρίσκεται μακριά από την περιοχή αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο υπομονάδων συνδέεται με αυτή με τη βοήθεια του βρόχου 280s [54]. Στο εσωτερικό της επιφάνειας που σχηματίζεται από την αλληλεπίδραση των δύο μονομερών, στη βάση μιας στενής διόδου εντοπίζεται $\sim 15 \text{ \AA}$ από την επιφάνεια του μορίου το καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου [55].

Οι αναστολείς που συνδέονται στο καταλυτικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, προκαλούν το κλείσιμο της στενής διόδου σταθεροποιώντας την T-διαμόρφωση, εμποδίζοντας με αυτόν το τρόπο την είσοδο του υποστρώματος, ενώ παράλληλα εμποδίζουν μεταβολές που είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό ενός λειτουργικού καταλυτικού κέντρου (μετατόπιση *Arg*₅₆₉ προς την καταλυτική σχισμή) [55].

Στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου η πρόσδεση της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων της με τα κατάλοιπα:

- *Gly*_{135, 675}
- *Leu*₁₃₆
- *Asn*_{284, 484}
- *His*₃₇₇
- *Val*₄₅₅
- *Glu*₆₇₂
- *Ala*₆₇₃
- *Ser*₆₇₄

Επίσης αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται και με ένα δίκτυο μορίων ύδατος που σχηματίζουν γέφυρες ανάμεσα σε άτομα γλυκόζης και άτομα γειτονικών αμινοξέων [56].

1.7.2 Κέντρο αναστολής

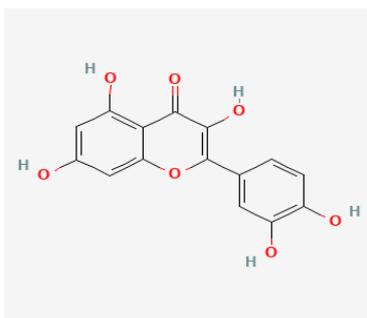
Αντίθετα με το καταλυτικό κέντρο, το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό του ενζύμου, το κέντρο αναστολής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου εντοπίζεται στην επιφάνεια του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα βρίσκεται στην είσοδο του καταλυτικού κέντρου ~12 Å από αυτό [44, 57]. Κοινές ονομασίες του αποτελούν: το κέντρο σύνδεσης της καφεΐνης ή θέση σύνδεσης νουκλεοσιδίων πουρίνης. Το κέντρο αναστολής αποτελεί μια υδρόφοβη περιοχή χαμηλής εξειδίκευσης που οριοθετείται από τα αμινοξέα *Phe*₂₈₅, *Tyr*₆₁₃ (οι φαινολικοί τους δακτύλιοι διατάσσονται σε απόσταση ~7 Å ο ένας από τον άλλον) [55]. Οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων αυτών σχηματίζουν υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές επιδράσεις με προσδέτες που συνδέονται σε αυτή την περιοχή [42]. Η σύνδεση αναστολέων στο κέντρο αναστολής έχει ως αποτέλεσμα την απόφραξη της εισόδου της καταλυτικής σχισμής, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της *T*- διαμόρφωσης του ενζύμου, αναστέλλοντας έτσι τη δραστηριότητά του [55].

1.7.3 Κέντρο σύνδεσης κερσετίνης

Η κερσετίνη ανήκει σε μία κατηγορία ενώσεων που ονομάζονται φλαβονοειδή και πρόκειται για μια ένωση που εντοπίζεται σε πληθώρα τροφίμων (μούρα

εσπεριδοειδή, κεράσια, κ.α.) με πιθανή αντιοξειδωτική και κυτταροπροστατευτική δράση [58]. Το κέντρο σύνδεσής της είναι ανεξάρτητο από το κέντρο αναστολής στο οποίο συνδέονται άλλα γνωστά φλαβονοειδή όπως η χρυσίνη και η φλαβοπυριδόλη και εντοπίζεται κοντά στην επιφάνεια του ενζύμου, ~32 Å από το κέντρο αναστολής και συγκροτείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα [46]:

- *Lys*_{544,655}, *Arg*₅₅₁, *Tyr*₅₄₈ (C- τελικής επικράτειας)
- *Glu*_{120,123} (N- τελικής επικράτειας)



Εικόνα 1.7.3.α: Χημική δομή μορίου κερσετίνης [59]

Η σύνδεση της κερσετίνης στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στις υδροξυλομάδες των A και B δακτυλίων του μορίου και των αμινοξέων που συγκροτούν αυτό το κέντρο σύνδεσης. Ειδικότερα μόλις η κερσετίνη συνδεθεί στο ένζυμο σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου με άτομα της πλευρικής αλυσίδα της *Arg*₅₅₁ και το καρβονυλικό οξυγόνο της κύριας αλυσίδας της *Lys*₅₄₄. Τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλίων 24 και 30 της κερσετίνης σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις γεφυρών ύδατος με τα καρβονυλικά οξυγόνα της κύριας αλυσίδας των αμινοξέων *Glu*₁₂₁ και *Lys*₆₅₅ ενώ το υδροξύλιο 29 εμπλέκεται σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων γεφυρών ύδατος με τα καρβονύλια των *Leu*₄₉₄, *Cys*₄₉₅ και *Glu*₆₅₄ [46]. Δομικά δεδομένα από το σύμπλοκο της *GPb* με την κερσετίνη έχουν δείξει ότι η επίδραση της σύνδεσης της στην T- διαμόρφωση είναι αμελητέα ενώ αντίθετα όταν προσδένεται στην R- διαμόρφωση προκαλεί δομικές μεταβολές στο βρόχο 548-556 που συμμετέχει στο σχηματισμό μίας από τις δύο πλευρές του κέντρου σύνδεσης. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στο γεγονός ότι η πρόσδεση της κερσετίνης έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της λιγότερο δραστηκής T- διαμόρφωσης του ενζύμου. [46, 60].

1.7.4 Κέντρο αποθήκευσης γλυκογόνου

Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου ταυτοποιήθηκε έπειτα από μελέτες πρόσδεσης ολιγοσακχαριτών στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου και πιο συγκεκριμένα της μαλτοπενταόζης και της μαλτοεπταόζης, ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι έχουν την δυνατότητα σύνδεσης και στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου λειτουργώντας ως υποστρώματα [61]. Ο ακριβής ρόλος του κέντρου αποθήκευσης του γλυκογόνου δεν είναι τελείως κατανοητός, ωστόσο πιθανολογείται ότι είναι απαραίτητο για τη σύνδεση του γλυκογόνου με τέτοιον τρόπο ώστε να αυξηθούν τα διαθέσιμα μη αναγωγικά άκρα και να ξεκινήσει η διαδικασία της κατάλυσης [61]. Αυτό εντοπίζεται στην επικράτεια 1 του ενζύμου, στο εξωτερικό της πρωτεΐνης, ~39 Å από το αλλοστερικό κέντρο και ~30 Å από το καταλυτικό κέντρο και οργανώνεται σε δύο υποπεριοχές στις οποίες προσδέονται μόρια γλυκόζης (S3-S7, S8-S9). Η πρώτη υποπεριοχή (S3-S4-S5-S6-S7) αποτελείται από:

- α_{12} και α_{13} έλικες (κατάλοιπα 369-418 και 420-429 αντίστοιχα)
- βρόχο που συνδέει δύο αντιπαράλληλα β -κλώνους τους β_{15} (κατάλοιπα 430-432) και β_{16} (κατάλοιπα 411-437)

Η δεύτερη υποπεριοχή (S8-S9) αποτελείται από:

- Ένα βρόχο στην κορυφή της α_{12} έλικας που συνδέει τα αντιπαράλληλα β -φύλλα β_8 - β_9 (κατάλοιπα 198-209 και 212-223 αντίστοιχα) με την *Val*₃₅₄ από την έλικα α_9 [61].

1.7.5 Αλλοστερικό κέντρο

Σε ένα λειτουργικό διμερές φωσφορυλάσης του γλυκογόνου, αντίθετες περιοχές της κάθε υπομονάδας αλληλεπιδρούν ώστε να σχηματίσουν το αλλοστερικό κέντρο του ενζύμου [62]. Στο αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου συνδέονται κυρίως φωσφορυλιωμένες ενώσεις (όπως: οι ενεργοποιητές *AMP*, *IMP*, και οι αναστολείς: *ATP*, *G6P*, *UDP*- γλυκόζη). Οι αλληλεπιδράσεις στις οποίες οφείλεται η σύσταση του αλλοστερικού κέντρου είναι δύο. Η πρώτη από αυτές είναι η διεπαφή μιας περιοχής επικαλύμματος με την έλικα α_2 (*cap*/ α_2) και περιλαμβάνει

την αλληλεπίδραση ανάμεσα στην περιοχή του επικαλύμματος της μίας υπομονάδας (κατάλοιπα 37-47) με τον κλώνο β_7 και την έλικα α_2 της άλλης (κατάλοιπα 47-78). Η δεύτερη από την άλλη πλευρά περιλαμβάνει την διεπαφή του πύργου που περιλαμβάνει την αντιπαράλληλη διάταξη δύο συμμετρικών ελίκων α_8 (κατάλοιπα 289-314). Το αλλοστερικό κέντρο είναι επενδυμένο από δύο α - έλικες, την α_7 και α_8 καθώς και από έναν μικρό β - κλώνο, το β_7 ενώ τελικά καλύπτεται από το επικάλυμμα [62].

1.7.6 Νέο αλλοστερικό κέντρο

Κρυσταλλογραφικές μελέτες για την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης της ένωσης CP320626 στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου είχαν ως αποτέλεσμα την ταυτοποίηση ενός νέου κέντρου σύνδεσης, άγνωστο μέχρι πρότινος, το οποίο εντοπίζεται στην κεντρική κοιλότητα ανάμεσα στις δύο υπομονάδες της φωσφορυλάσης [45, 63]. Το νέο αυτό κέντρο σύνδεσης ονομάστηκε νέο αλλοστερικό κέντρο και εντοπίζεται $\sim 15 \text{ \AA}$ από το αλλοστερικό κέντρο, $\sim 33 \text{ \AA}$ από το καταλυτικό και $\sim 37 \text{ \AA}$ από το κέντρο αναστολής [63]. Το μήκος της κεντρικής κοιλότητας αντιστοιχεί σε $\sim 30 \text{ \AA}$ με ακτίνα που κυμαίνεται από 4-8 \AA περικλείοντας έναν όγκο $\sim 1300 \text{ \AA}^3$. Είναι μία μερικώς κλειστή κοιλότητα, από τα αμινοξικά κατάλοιπα που από την μία πλευρά συγκροτούν το επικάλυμμα και τις έλικες α_2 (*Arg*₃₃, *His*₃₄, *Arg*₆₀, *Asp*₆₁ καθώς και τα συμμετρικά τους) και από την άλλη τις έλικες-πύργους α_7 (*Asn*₂₇₀, *Glu*₂₇₃, *Ser*₂₇₆ καθώς και τα συμμετρικά τους). Τα συνολικά 18 κατάλοιπα αμινοξέων από τα οποία συγκροτείται αυτή η περιοχή σύνδεσης είναι συντηρημένα σε όλες τις ισομορφές του ενζύμου [55].

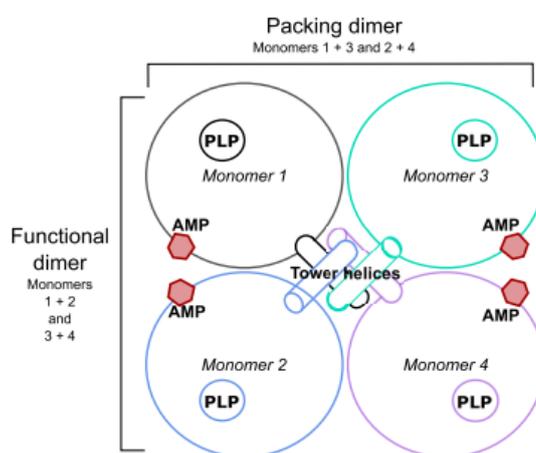
1.8 Διεπαφή υπομονάδων των GP

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο οι GPs εμφανίζονται κυρίως σε διμερή και τετραμερή, τα οποία απουσία AMP ή φωσφορυλίωσης παραμένουν στην ανενεργή τους διαμόρφωση. Κατά την ενεργοποίηση των GPs οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις υπομονάδες αναδιοργανώνονται επιτρέποντας τη μετάπτωση από την ανενεργή T διαμόρφωση στην ενεργή R διαμόρφωση. Κατά την ενεργοποίησή της η mGP σχηματίζει τετραμερή, ενώ η IGP παραμένει ως διμερές, γεγονός που

αιτιολογείται από τη δομή της. Από την άλλη πλευρά η *bGP* απαντάται σε ισορροπία ανάμεσα σε μονομερή και διμερή. Η ενεργοποίηση της οποίας ευνοεί την κατάσταση διμερούς. Σε κρυστάλλους η *bGP* εμφανίζεται ως τετραμερές, ομοίως με την *mGP*, κάθε μονομερές αλληλεπιδρά με τα άλλα τρία, για αυτό και έχουν οριστεί τρεις μονάδες διεπαφής [31].

Οι τρεις μονάδες διεπαφής είναι:

1. Το λειτουργικό διμερές, που αποκρίνεται στο ενεργό διμερές (απαρτίζεται από τα μονομερή 1-2, 3-4 κατά τον οριζόντιο άξονα)
2. Το διμερές (απαρτίζεται από τα μονομερή 1-3, 2-4 κατά τον κάθετο άξονα)
3. Ο πυρήνας των ελίκων-πύργων [31].



Εικόνα 1.8.α: Σχηματική απεικόνιση των μονάδων διεπαφής ενός λειτουργικού τετραμερούς *GP* (επεξεργασμένη: [31]).

1.8.1 Το λειτουργικό διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου

Έχει βρεθεί ότι η αλληλεπίδραση δύο μονομερών φωσφορυλάσης σε ένα λειτουργικό διμερές περιλαμβάνει:

- Την έλικα α_2 (κατάλοιπα: 49-77)
- Το βρόχο β_4 - β_5 (κατάλοιπα 180-198)
- Το βρόχο του επικαλύμματος (κατάλοιπα 41-48)
- Τις έλικες-πύργους (κατάλοιπα 259-278)

Η διεπαφή των τριών πρώτων στοιχείων περιλαμβάνει το αλλοστερικό κέντρο της φωσφορυλάσης του εγκεφάλου. Η παρουσία *AMP* έχει ως αποτέλεσμα την ανακατάταξη του κέντρου πιο κοντά στην *AMP*, γεγονός που επιτρέπει την αλληλεπίδραση των δύο υπομονάδων φέρνοντας το βρόχο του επικαλύμματος πιο κοντά στην έλικα α_2 και το βρόχο β_4 - β_5 , σταθεροποιώντας τον ένζυμο στην ενεργή του διαμόρφωση.

Οι έλικες πύργου αποτελούνται από την αντιπαράλληλη επαφή των ελίκων α_7 με τα ισοδύναμα συμμετρικά τους και συνδέονται με το βρόχο της πύλης (κατάλοιπα 279-289). Ανάλογα με την κατάσταση στην οποία απαντάται το ένζυμο (ενεργή-ανενεργή) απαντάται και ο βρόχος της πύλης (κλειστός-ανοιχτός) [41, 64, 65]. Στις τρεις ισομορφές του ενζύμου (εγκεφαλική, μυϊκή, ηπατική) οι έλικες πύργου σταθεροποιούνται από μη πολικές αλληλεπιδράσεις των αμινοξικών καταλοίπων *Val*₂₆₆, *Leu*₂₉₇, *Asn*₂₇₀ καθώς και των αντίστοιχών τους στην άλλη υπομονάδα. Ωστόσο σε αντίθεση τόσο με την μυϊκή όσο και την ηπατική ισομορφή του ενζύμου στην εγκεφαλική ισομορφή του ενζύμου φαίνεται ότι οι πύργοι έλικες σχηματίζουν δύο επιπλέον δεσμούς υδρογόνου (ανάμεσα στις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Tyr*₂₆₂-*Asn*₂₇₀) [31].

1.8.2 Το διμερές της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του εγκεφάλου

Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε δύο λειτουργικά διμερή της *bGP* βασίζονται σε αλληλεπιδράσεις που περιλαμβάνουν:

- Τις έλικες-πύργους
- Το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου (κατάλοιπα 426-434)
- Την δέσμη α_{26} - α_{29} ελίκων (κατάλοιπα 721-769)

Μέχρι στιγμής δεν έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός τετραμερούς στην ηπατική ισομορφή του ενζύμου [65].

Οι πύργοι έλικες στην *bGP* έχουν σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις για την συγκρότηση του διμερούς, σταθεροποιώντας περαιτέρω την διαμόρφωσή του, σε αντίθεση με την μυϊκή ισομορφή [66]. Στο *N*-τελικό άκρο των ελίκων πύργων στην *bGP* παρατηρούνται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα αμινοξικά

κατάλοιπα: *Val*₂₅₉, *Tyr*₂₆₂, *Ile*₂₆₃ με τα συμμετρικά τους. Η πύλη της κάθε υπομονάδας σταθεροποιείται στην ανοικτή της διαμόρφωση μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα κατάλοιπα *Phe*₂₈₆, *Asn*₂₈₁ με τα συμμετρικά τους. Παρόλα αυτά ο αριθμός των αλληλεπιδράσεων φαίνεται να μειώνεται με την παρουσία κάποιου αλλοστερικού ρυθμιστή, επηρεάζοντας κυρίως το κέντρο αποθήκευσης του γλυκογόνου [31].

1.8.3 Ο πυρήνας των ελίκων πύργων

Οι πύργοι έλικες στην εγκεφαλική ισομορφή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου αποτελούν τον πυρήνα του τετραμερούς, όπως και για τη μυϊκή ισομορφή [66]. Οι έλικες πύργοι της *bGP* συνδεδεμένης με *AMP* είναι κατά δύο στροφές μεγαλύτερες από αυτές στη *mGP* συνδεδεμένης με *AMP* [41], δίνοντας την δυνατότητα σε κάθε έλικα να αλληλεπιδράσει με τις άλλες που απαντώνται στις άλλες τρεις υπομονάδες. Έτσι, οι απέναντι διατεταγμένες υπομονάδες του τετραμερούς (π.χ. μονομερή 1-4) μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους μέσω μη πολικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα αμινοξέα *Leu*₂₇₁ και *Gly*₂₆₀, καθώς και στα *Leu*₂₆₈, *Ile*₂₆₇, από τη μία πλευρά με αντίστοιχα από την άλλη. Παρόλου που οι αλληλεπιδράσεις των πύργων ελίκων συνιστούν λιγότερο από το 10% των συνολικών αλληλεπιδράσεων σε ένα ενεργό τετραμερές *mGP*, το πράγμα αυτό φαίνεται να μην ισχύει στην περίπτωση της *bGP* στην οποία συνιστούν ~25% των αλληλεπιδράσεων [31].

1.9 Εντοπισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο

Δεδομένου των πολλών διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει ο εγκέφαλος, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι το γλυκογόνο σε αυτόν εντοπίζεται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους σε αντίθεση με το μυϊκό και τον ηπατικό ιστό, στους οποίους το γλυκογόνο εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα [67].

Ανάλογα με την ωριμότητα του οργανισμού παρατηρείται και χαρακτηριστικός εντοπισμός του γλυκογόνου στον εγκέφαλο [67]. Στους εγκεφάλους ενήλικων ατόμων το γλυκογόνο απαντάται σχεδόν αποκλειστικά στα αστροκύτταρα, ενώ στους εγκεφάλους νεογνών παρουσιάζεται και στους νευρώνες γεγονός που μπορεί να

οφείλεται στην αυξημένη μεταβολική τους δραστηριότητα [68]. Καθώς τα άτομα προχωράνε στην ενηλικίωση το γλυκογόνο καταλήγει να εντοπίζεται εκτός από τα αστροκύτταρα σε μικρό αριθμό νευρώνων όπως τα επενδυματικά κύτταρα και τα κύτταρα του χοροειδούς πλέγματος [69].

Το γλυκογόνο στον εγκέφαλο εντοπίζεται τόσο στην λευκή όσο και την φαιά ουσία του εγκεφάλου, χωρίς να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένο. Μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σε κοκκία γλυκογόνου έχουν αποδείξει ότι η συγκέντρωση του γλυκογόνου στο νευρικό ιστό είναι ανάλογη με τον αριθμό των συνάψεων που σχηματίζονται [67]. Οι περιοχές της φαιάς ουσίας στις οποίες παρατηρούνται μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκογόνου είναι:

- Γέφυρα
- Προμήκης μυελός
- Παρεγκεφαλίδα
- Ιππόκαμπος
- Υποθάλαμος
- Θάλαμος
- Εγκεφαλικός φλοιός
- Ραβδωτό σώμα

Ωστόσο παρατηρούνται και περιοχές της λευκής ουσίας του εγκεφάλου στις οποίες απαντάται γλυκογόνο, με τις περισσότερες μελέτες να συνηγορούν ότι το γλυκογόνο στην φαιά ουσία βρίσκεται σε δύο φορές μεγαλύτερη ποσότητα από ότι στην λευκή [67].

1.10 Ρόλος του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα

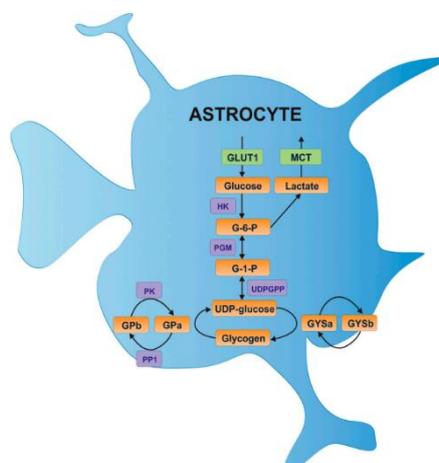
Εάν συγκρίνουμε τα αποθέματα του γλυκογόνου που απαντώνται στα αστροκύτταρα με αυτά στα μυϊκά και τα ηπατικά παρατηρούμε ότι η παρουσία γλυκογόνου στον εγκέφαλο θεωρείται αμελητέα και για αυτό το λόγο για πολλά χρόνια είχε παραμεληθεί η παρουσία του στον νευρικό ιστό [67]. Τα αποθέματα γλυκογόνου των ηπατοκυττάρων είναι ικανά να διατηρήσουν τα επίπεδα της γλυκόζης σε επιθυμητά επίπεδα για περίπου 24 ώρες χωρίς να υπάρχει εξωγενής πρόσληψη γλυκόζης, με τα

ανάλογα του εγκεφάλου να μπορούν να παρέχουν προστασία για πολύ περιορισμένο χρόνο. Ο νευρικός ιστός απαιτεί περίπου 100 $\mu\text{mol O}_2$ για κάθε γραμμάριο νευρικού ιστού σε μία ώρα, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι πλήρης αερόβιος μεταβολισμός θα απαιτούσε 600 μmol γλυκόζης σε μια ώρα και εφόσον η συγκέντρωση του γλυκογόνου στον νευρικό ιστό ανέρχεται περίπου στα (0.5-1.5 $\mu\text{mol/g}$) σημαίνει ότι τα αποθέματα αυτά είναι ικανά να τροφοδοτούν τον νευρικό ιστό με ενέργεια για λίγα μόνο λεπτά. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δύο κύριοι ρόλοι του γλυκογόνου στον εγκέφαλο:

- Παροχή ενέργειας σε υπογλυκαιμικές καταστάσεις
- Παροχή ενέργειας σε περιπτώσεις που ο νευρικός ιστός του εγκεφάλου έχει αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις [67]

1.11 Μεταβολισμός γλυκογόνου στον εγκέφαλο

Η γλυκόζη εισέρχεται σε αστροκύτταρα μέσω του μεταφορέα γλυκόζης *GLUT1* και πιθανόν μέσω του *GLUT4* (ευαίσθητου στην ινσουλίνη). Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται από την εξοκινάση προς 6-φωσφορική-γλυκόζη (*G6P*) και έπειτα ισομεριώνεται σε 1-φωσφορική-γλυκόζη (*G1P*) από την φωσφογλυκομουτάση, στη συνέχεια μετατρέπεται σε *UDP*-γλυκόζη από την πυροφωσφατάση της *UDP*-γλυκόζης. Τελικά η γλυκόζη του μορίου αυτού μέσω της δράσης της *GYS* θα συνδεθεί στο πολυμερές του γλυκογόνου, όταν ωστόσο οι συνθήκες το απαιτήσουν, η *GP* θα ενεργοποιηθεί προκειμένου να τροφοδοτηθεί η γλυκολιτική πορεία με γλυκόζη με σκοπό την παραγωγή ενέργειας [67].



Εικόνα 1.11.α: Ο μεταβολισμός του γλυκογόνου στο εσωτερικό των αστροκυττάρων [70].

Μέχρι πρόσφατα επικρατούσε η άποψη ότι λόγω των υψηλών ενεργειακών απαιτήσεών τους οι νευρώνες συνθέτουν ενέργεια κυρίως από τον οξειδωτικό μεταβολισμό της γλυκόζης (κύκλος *Krebs* και αναπνευστική αλυσίδα) χρησιμοποιώντας ως κύριο καύσιμο την γλυκόζη [71]. Ωστόσο, πολλά στοιχεία συνηγορούν στο γεγονός ότι οι νευρώνες μπορούν να χρησιμοποιήσουν αποτελεσματικά το γαλακτικό οξύ και το προτιμούν έναντι της γλυκόζης όταν η γλυκόζη και το γαλακτικό βρίσκονται σε ίδιες περίπου ποσότητες [71]. Ο μεταβολισμός της γλυκόζης στα αστροκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο αφού μετατραπεί σε γαλακτικό οξύ από τη γαλακτική αφυδρογονάση (*LDH5*) θα εξέλθει από τα αστροκύτταρα μέσω μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών οξέων (*MCT*), και από αντίστοιχους μεταφορείς στους νευρώνες θα εισέλθει σε αυτούς. Μέσα στους νευρώνες το γαλακτικό, θα μετατραπεί σε πυροσταφυλικό οξύ από τη γαλακτική αφυδρογονάση (*LDH1*) και θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ενέργειας τροφοδοτώντας τον κύκλο του *Krebs* [72].

Η σύνδεση αυτή που παρουσιάζει ο μεταβολισμός της γλυκόζης στα αστροκύτταρα και τους νευρώνες είναι πολύ σημαντική, κυρίως κατά τη διαδικασία σχηματισμού της μνήμης, γεγονός που απεδείχθη από μελέτες σε εγκεφάλους ποντικών. Σε αυτές τις μελέτες εξετάστηκε η επίδραση που μπορεί να έχει η αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου στον εγκέφαλο από τον αναστολέα 1,4-διδεοξυ-1,4-ιμινο-*D*-αραβινιτόλη (*DAB*). Τα αποτελέσματα της μελέτης απέδειξαν ότι η γλυκογονόλυση στον εγκέφαλο είναι απαραίτητη για την μακροπρόθεσμη ενδυνάμωση (*Long Term Potentiation-LTP*), μια διαδικασία η οποία φαίνεται να διαταράσσεται σε διάφορες παθολογίες του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένου και νευροεκφυλιστικών διαταραχών όπως η νόσος *Alzheimer* [73].

Κατά τη διαδικασία της μάθησης παρουσιάζεται αύξηση του εξωκυτταρικού γαλακτικού οξέος που προέρχεται από αστροκύτταρα στην περιοχή του υπόκαμπου [73]. Η μακροπρόθεσμη μνήμη φαίνεται να εξαρτάται από τη διάσπαση του γλυκογόνου στα αστροκύτταρα και την πρόσληψη του γαλακτικού οξέος από τους νευρώνες αφού διαταραχές της έκφρασης των μεταφορέων μονοκαρβοξυλικών

οξέων των αστροκυττάρων *MCT1* ή *MCT4* έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια μνήμης [73].

1.12 Επιπτώσεις διαταραχής μεταβολισμού της γλυκόζης στον εγκέφαλο

Ένα βασικό χαρακτηριστικό του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι η παρουσία κοκκίων α- και β- γλυκανών (*corpora amylacea*) [23, 74]. Τα κοκκία αυτά σε φυσιολογικές συνθήκες συναντώνται στον εγκέφαλο υγιών ηλικιωμένων ανθρώπων και άλλων θηλαστικών. Προέρχονται από νευρογλοιακά κύτταρα και είναι σφαιρικά σε σχήμα με την διάμετρό τους να ανέρχεται περίπου στα 10-50 μm [74]. Η εσωτερική δομή των κοκκίων αυτών χαρακτηρίζεται από την παρουσία μικρών γραμμικών πυκνωμάτων που στην περιφέρειά τους διαθέτουν ινίδια [75]. Η πρώτη αναφορά σε αυτά έγινε από τον *Purkinje* το 1837 μελετώντας τους εγκεφάλους ηλικιωμένων ατόμων [74]. Ιστοχημικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κοκκία αυτά αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες αλλά και πρωτεΐνες οι οποίες σχετίζονται με το γήρας και το κυτταρικό στρες (ουβικιτίνη, πρωτεΐνες θερμικού σοκ, τρανσγλουταμινάσες κ.α.) [75]. Πλέον η παρουσία αυτών των κοκκίων θεωρείται ότι είναι ένα καθολικό γεγονός με την πάροδο του χρόνου που είναι αποτέλεσμα κάποιων επίκτητων μεταβολών που οδηγούν στο λανθασμένο μεταβολισμό της γλυκόζης [74].

Πληθώρα νευροεκφυλιστικών ασθενειών χαρακτηρίζονται από την συσσώρευση τέτοιου είδους κοκκίων, ανάμεσα σε αυτές είναι και η νόσος του *Alzheimer* καθώς και η προοδευτική μυοκλονική επιληψία *MELF* (ασθένεια *Lafora*) [74].

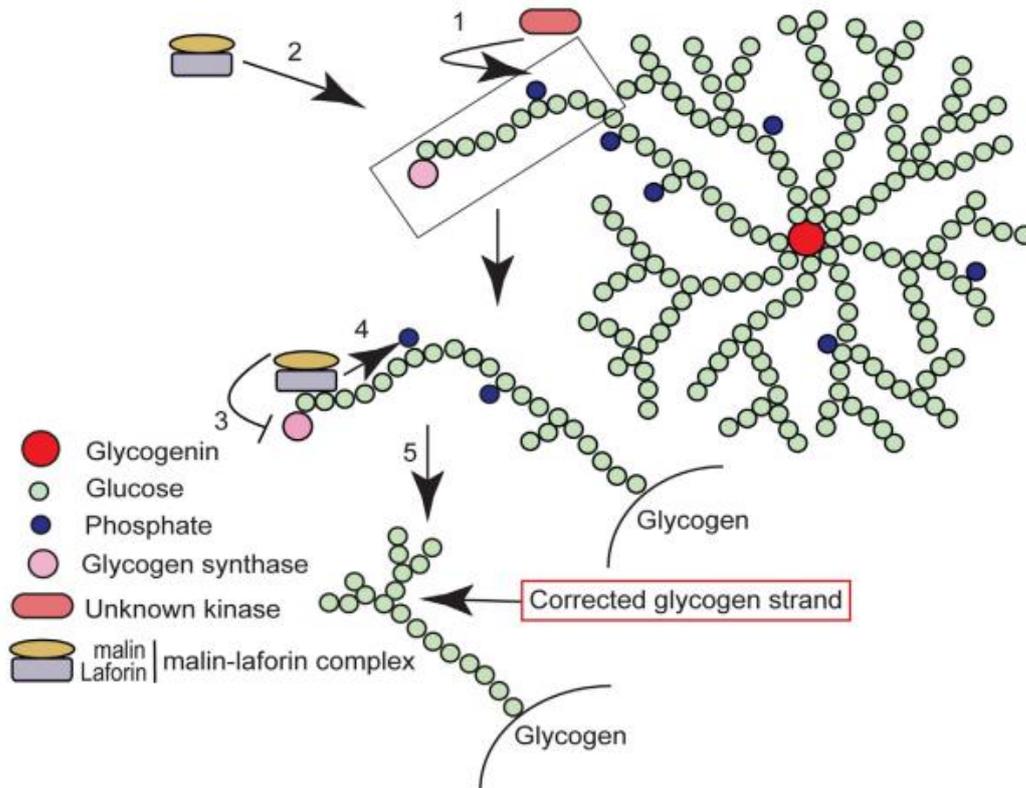
1.13 Προοδευτική μυοκλονική επιληψία *MELF* (ασθένεια *Lafora*)

Η προοδευτική μυοκλονική επιληψία *MELF* ή αλλιώς ασθένεια *Lafora* είναι μια σπάνια κληρονομική ασθένεια που ακολουθεί αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονόμησης [76, 77]. Τα πρώτα συμπτώματα εμφανίζονται κατά την εφηβεία και τυπικά οδηγεί σε θάνατο μέσα στα πρώτα 10 χρόνια από την εμφάνισή τους. Η ασθένεια περιγράφηκε για πρώτη φορά πριν από περίπου 100 χρόνια από τους *Lafora* και *Glück* [78]. Η διάγνωση της ασθένειας δεν είναι εύκολη καθώς φαινομενικά υγιή άτομα εμφανίζουν ξαφνικά επιληψίες διαφορετικών ειδών, που στην αρχή

μπορούν και αντιμετωπίζονται με την κατάλληλη αντιεπιληπτική αγωγή [79, 80]. Σε μετέπειτα στάδια παρουσιάζονται και άλλα συμπτώματα όπως αλλαγή συμπεριφοράς, σύγχυση, κατάθλιψη, αταξία και δυσαρθρία. Με το πέρασμα του χρόνου οι επιληπτικές κρίσεις γίνονται συχνές και ανεξέλεγκτες, ενώ σε τελικό στάδιο οι ασθενείς πέφτουν σε κώμα και τελικά καταλήγουν [81].

Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί δύο γονίδια που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση αυτής της ασθένειας. Το πρώτο είναι το *EMP2A*, που κωδικοποιεί τη λαφορίνη, μία φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης και το δεύτερο είναι το *EMP2B* που κωδικοποιεί τη μαλίνη, μία λιγάση E3 της ουβικιτίνης [81]. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού του γλυκογόνου στα νευρικά κύτταρα [81]. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά έχουν ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη σωστά διακλαδισμένου γλυκογόνου (σωμάτια *Lafora*) που κατακρημνίζεται οδηγώντας σε απόπτωση των νευρικών κυττάρων και τελικά σε νευροεκφυλισμό [81, 82].

Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η λαφορίνη και η μαλίνη συμμετέχουν στο μεταβολισμό του γλυκογόνου δεν είναι ακόμα γνωστός, ωστόσο έχουν διατυπωθεί μερικοί μηχανισμοί, βάση των οποίων γίνονται ορισμένες υποθέσεις [81]. Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο λειτουργούν η μαλίνη και η λαφορίνη προτείνει ότι μια άγνωστη κινάση φωσφορυλιώνει μεγάλες και μη σωστά διακλαδισμένες αλυσίδες γλυκογόνου που μπορεί να προκύπτουν από κάποια τυχαία διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στη λειτουργία των ενζύμων σύνθεσης και διακλαδισμού του γλυκογόνου. Η λαφορίνη και μαλίνη σχηματίζουν ένα σύμπλοκο το οποίο μέσω της επικράτειας σύνδεσης με υδατάνθρακες της λαφορίνης συνδέεται στα άκρα αυτά, η μαλίνη ουβικουϊτινώνει και οδηγεί σε αποικοδόμηση πρωτεΐνες υπεύθυνες για το σχηματισμό του γλυκογόνου (συνθάση του γλυκόνου, πρωτεϊνική φωσφατάση 1) σταματώντας την επιμήκυνση της συγκεκριμένης αλυσίδας του γλυκογόνου. Τελικά, η λαφορίνη απομακρύνει τη φωσφορική ομάδα που έχει τοποθετηθεί από την άγνωστη κινάση, επιτρέποντας στην αλυσίδα να αποικοδομηθεί από τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου. Τέλος, η μαλίνη ουβικουϊτινώνει τη λαφορίνη η οποία θα απομακρυνθεί, με το αποτέλεσμα της όλης διαδικασίας να είναι μια σωστή αλυσίδα γλυκογόνου [83].



Εικόνα 1.13.α: Προτεινόμενος μηχανισμός παθογένεσης της ασθένειας *Lafora* [83].

1.14 Νόσος *Alzheimer*

Η νόσος *Alzheimer* περιγράφηκε για πρώτη φορά από το Γερμανό νευρολόγο *Alois Alzheimer* το 1907 [84], πρόκειται για την πιο κοινή νευροεκφυλιστική ασθένεια που πλήττει τους ηλικιωμένους. Σύμφωνα με την Εταιρία νόσου *Alzheimer* (*Alzheimer's Association*), η συγκεκριμένη νόσος είναι υπεύθυνη για το 60-80% των περιπτώσεων άνοιας [85]. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν 50 εκατομμύρια ασθενείς παγκοσμίως, ενώ οι πιθανότητες εμφάνισης φαίνεται να διπλασιάζονται κάθε πέντε χρόνια μετά την ηλικία των 65 ετών. Πρόκειται για μία προοδευτική νόσο η οποία ξεκινάει με ήπιου τύπου συμπτώματα (ελαφρώς μειωμένες γνωστικές ικανότητες) και καταλήγει σε άνοια. Τελικά οι ασθενείς γίνονται κληήρης και καταλήγουν [86].

Η νόσος *Alzheimer* μπορεί να είναι: όψιμης έναρξης (όταν η ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων είναι >65 ετών), πρώιμης έναρξης (όταν η ηλικία εμφάνισης των συμπτωμάτων είναι <65 ετών), σποραδική ή οικογενής [87]. Η σποραδική μορφή της

νόσου φαίνεται να οφείλεται σε πληθώρα γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, ενώ στην οικογενή μορφή της νόσου παρατηρούνται με μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεις στα γονίδια της πρόδρομης πρωτεΐνης αμυλοειδούς (*APP*) και των πρενσελινών 1,2 (*PSEN1,2*) [86].

Η νόσος αυτή χαρακτηρίζεται από την παρουσία γεροντικών πλακών ή πλακών αμυλοειδούς καθώς και νευροϊνιδιακών συμπλεγμάτων που αποτελούν αλλοιώσεις του νευρικού ιστού. Οι γεροντικές πλάκες είναι αλλοιώσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία β-αμυλοειδούς. Το β-αμυλοειδές προκύπτει από μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που είναι γνωστή ως πρόδρομη πρωτεΐνη αμυλοειδούς (*APP*) της οποίας η πρωτεόλυση από τις α-,β- σεκρετάσες έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πεπτιδίων τα οποία λειτουργούν προστατεύοντας τον νευρικό ιστό. Ωστόσο διαδοχική πρωτεόλυση της *APP* από τις α-,β-,γ- σεκρετάσες οδηγεί στη δημιουργία του αμυλοειδούς β42, το οποίο συσσωματώνεται και κατακρημνίζεται γύρω από τα αγγεία των μηνίγγων και του εγκεφαλικού φλοιού προκαλώντας κυτταροτοξικότητα. Τα νευροϊνιδιακά συμπλέγματα συναντώνται στον ιππόκαμπο και τον εγκεφαλικό φλοιό και είναι το αποτέλεσμα των συσσωματωμάτων που προκύπτουν από την υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *tau*, η οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζει την δομή των μικροσωληνίσκων [88].

Παρόλο που υπάρχουν πολλές υποθέσεις που μπορούν να εξηγήσουν την εμφάνιση της συγκεκριμένης νόσου όπως η επίδραση του α-αμυλοειδούς, η υπερ-φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης *tau*, η εμπλοκή νευροδιαβιβαστών ή το οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να οφείλεται στην παρουσία των κοκκίων α-, β- γλυκανών που αναφέρθηκαν προηγουμένως, δεν έχει ξεκαθαριστεί ποιες είναι οι υποκείμενες αιτίες της νόσου ή ποιες θεραπευτικές προσεγγίσεις μπορούν να ακολουθηθούν [74, 86, 89] .

2. Σκοπός

Όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 1.12 λόγω διαφόρων μεταβολών που προκύπτουν στο μεταβολισμό της γλυκόζης, είτε με την πάροδο του χρόνου, είτε ως αποτέλεσμα μεταλλάξεων σε γονίδια που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της γλυκόζης και του γλυκογόνου, τα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου συσσωρεύουν κοκκία α-,β-γλυκανών (*corpora amylocae*) [23, 74]. Τα κοκκία αυτά αποτελούν συχνό εύρημα στα νευρικά κύτταρα των ηλικιωμένων ατόμων ενώ έχει φανεί ότι η υπέρμετρη παρουσία τους αποτελεί αιτία εμφάνισης πολλών νευροεκφυλιστικών ασθενειών όπως η νόσος *Alzheimer*, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (*ALS*) καθώς και η νόσος *Lafora*. Πρόκειται για άκρως καταστροφικές αθεράπευτες ασθένειες οι οποίες οδηγούν τελικά σε θάνατο.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας αλλοστερικός ενεργοποιητής της φωσφορυλάσης του εγκεφάλου [90], η αρζανόλη, μία α- πυρόνη, με γνωστές αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, χρόνια γνωστή στο χώρο της βοτανικής [91]. Βιοχημικές μελέτες στη φωσφορυλάση του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο απέδειξαν ότι η αρζανόλη είναι ικανή να ενεργοποιήσει τη φωσφορυλάση με τον ίδιο τρόπο που την ενεργοποιεί και ο αλλοστερικός ενεργοποιητής *AMP* με αποτέλεσμα να την καθιστούν ικανό φαρμακευτικό μόριο που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την θεραπεία παθολογικών καταστάσεων του εγκεφάλου στις οποίες παρατηρείτε υπέρμετρη συσσώρευση γλυκογόνου ή άλλων μορίων που μοιάζουν με αυτό (*corpora amylocae*) [90].

Η παρούσα διπλωματική εργασία είχε ως σκοπό το βιοχημικό χαρακτηρισμό της ανασυνδυασμένης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου του ανθρώπινου εγκεφάλου, προκειμένου να γίνει κατανοητή η συμπεριφορά της συγκεκριμένης ισομορφής του ενζύμου με τη χρήση ορισμένων αναστολέων της (βαϊκαλεΐνη, καφεΐνη), ώστε μετέπειτα να προχωρήσουμε τη μελέτη άλλων χημικών ενώσεων με αντίθετη δράση (ενεργοποιητές), με βάση τους οποίους θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένας νέος ενεργοποιητής του ενζύμου ως εν δυνάμει φάρμακο για τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

3. Πειραματικό μέρος

3.1 Υλικά

3.1.1 Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
<i>β-Glycerol phosphate disodium salt pentahydrate (β-G1P)</i>	<i>SIGMA</i>
<i>β-Mercaptoethanol</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Acetic Acid</i>	<i>Fluka, Panreac</i>
<i>Acrylamide</i>	<i>SERVA</i>
<i>Adenosine 5'-monophosphate monohydrate (AMP)</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Agarose</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Ammonium molybdate</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Ammonium Persulfate (APS)</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Bis-Acrylamide</i>	<i>SERVA</i>
<i>Bradford protein assay 5X</i>	<i>Bio-Rad</i>
<i>Bromophenol Blue</i>	<i>Research organics</i>
<i>Calcium Chloride dehydrate</i>	<i>MERCK</i>
<i>Chloramphenicol</i>	<i>AppliChem</i>
<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	<i>Fluka</i>
<i>D-(+)- Glucose</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Dimethylsulfoxide (DMSO)</i>	<i>Panreac AppliChem</i>
<i>Dithiothreitol (DTT)</i>	<i>SERVA</i>
<i>DNA Ladder RTU (1Kb) - Ready to use</i>	<i>Nippon Genetics</i>
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)</i>	<i>Panreac</i>
<i>Ethanol Absolute</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Glycerol</i>	<i>Panreac</i>
<i>Glycine</i>	<i>SERVA</i>
<i>Glycogen from oyster type II</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Hepes</i>	<i>SERVA</i>
<i>Hydrochloric Acid (HCl)</i>	<i>MERCK</i>

<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)</i>	<i>SERVA</i>
<i>Imidazole Bio Ultra</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Kanamycin monosulphate</i>	<i>AppliChem</i>
<i>L-Arabinose</i>	<i>AppliChem</i>
<i>L-Ascorbic Acid</i>	<i>SIGMA</i>
<i>LB Agar, Powder</i>	<i>SERVA</i>
<i>LB Medium-powder according to Miller</i>	<i>Panreac-AppliChem</i>
<i>Magnesium chloride, anhydrous, 99%</i>	<i>Alfa-Aesar</i>
<i>Mark12™ Unstained Standard</i>	<i>Invitrogene</i>
<i>MTG (3-Mercapto-1,2-propanediol)</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Page Ruler™ Prestained Protein Ladder</i>	<i>Thermo Scientific</i>
<i>PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)</i>	<i>AppliChem</i>
<i>Potassium Chloride (KCl)</i>	<i>MERCK</i>
<i>SDS (Sodium dodecyl Sulfate- SDS)</i>	<i>SERVA</i>
<i>Sodium Chloride (NaCl)</i>	<i>CHEM-LAB</i>
<i>Sodium Hydroxide (NaOH)</i>	<i>MERCK</i>
<i>TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)</i>	<i>MERCK</i>
<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	<i>SERVA</i>
<i>Triton X-100</i>	<i>MERCK</i>
<i>Tryptone</i>	<i>SIGMA</i>
<i>Yeast extract</i>	<i>SERVA</i>

Πίνακας 3.1.1.α: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας

3.1.2 Όργανα

Όργανο	Εταιρία
Αναλυτικός ζυγός	<i>Kern & Sohn GmbH</i>
Αυτόματες πιπέτες	<i>Gilson, Nichiryo</i>
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	<i>Bio-Rad</i>
Κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης	<i>Bio-Rad</i>
Μετρητής pH	<i>Metrohm</i>
Συσκευή απεικόνισης πηκτών	<i>Protein Simple Cambridge</i>

Υδατόλουτρο	<i>Wisebath</i>
Φυγόκεντροι	<i>Eppendorf Centrifuge 5810R, HermLe Z36HK, Hitachi</i>
ÄKTA purifier (FPLC system)	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
Dry Block heat bath	<i>Thermoleader</i>
Ultrasonic processor UP400S (400 W, 24kHz)	
Vortex	<i>Kisker</i>

Πίνακας 3.1.2.α: Όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας

3.1.3 Βακτηριακά Στελέχη

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά γενετικά τροποποιημένα στελέχη του βακτηρίου *E. coli*. Τα βακτηριακά στελέχη επιλέχθηκαν με σκοπό την έκφραση της πρωτεΐνης σε υψηλά επίπεδα σε διαλυτή μορφή.

Βακτηριακά στελέχη <i>E.coli</i>	Εταιρία
<i>BL21-Gold (DE3)</i>	<i>Agilent- Techologies</i>
<i>OverExpress C41 (DE3)</i>	<i>Lucigen</i>
<i>OverExpress C43 (DE3)</i>	<i>Lucigen</i>

Πίνακας 3.1.3.α: Γενετικά τροποποιημένα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας

3.1.4 Στήλες χρωματογραφίας

Στήλη χρωματογραφίας	Εταιρία
<i>HiTrap TALON Crude (5 mL)</i>	<i>GE Healthcare</i>
<i>Gel-filtration Superdex S200</i>	<i>GE Healthcare</i>

Πίνακας 3.1.4.α: Στήλες χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας

3.2 Θρεπτικά μέσα

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Τρυπτόνη	2 gr
<i>Yeast extract</i>	0,5 gr
<i>NaCl</i>	0,05 gr
<i>KCl</i>	250 mM
<i>MgCl₂</i>	0,01 M
<i>Glucose</i>	0,08 M

Πίνακας 3.2.α: Υγρό θρεπτικό μέσο *SOC medium*, Τελικός όγκος υγρού θρεπτικού μέσου είναι 100 mL, pH= 7,5.

LB-Agar: Η τελική σύσταση του στερεού θρεπτικού μέσου LB-Agar είναι $35 \frac{gr}{L}$.

LB-Broth: Η τελική σύσταση του υγρού θρεπτικού μέσου LB Broth να είναι $25 \frac{gr}{L}$.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Δημιουργία επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli*

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν γενετικό υλικό μέσω τριών διαδικασιών: της σύζευξης, της επαγωγής και του μετασχηματισμού [92]. Η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού από ένα βακτήριο σε ένα άλλο γίνεται μέσω της σύζευξης, ενώ η επαγωγή περιλαμβάνει τη μεταφορά γενετικού υλικού με τη βοήθεια ενός βακτηριοφάγου. Κατά το μετασχηματισμό ελεύθερο DNA μπορεί να διαπεράσει στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις [93]. Ο μετασχηματισμός είναι μια διαδικασία η οποία πραγματοποιείται είτε φυσικά είτε τεχνητά. Φυσικά πραγματοποιείται σπάνια από τα βακτήρια με σκοπό τη πρόσληψη γενετικού υλικού από το περιβάλλον. Τεχνητά, από την άλλη πλευρά, μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή συγκεκριμένων εργαστηριακών συνθηκών. Οι δύο κύριοι μέθοδοι τεχνητού μετασχηματισμού περιλαμβάνουν:

- Την επώαση των βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα $CaCl_2$ η οποία ακολουθείται από σύντομο θερμικό σοκ (χημική μέθοδος).

- Την ηλεκτροδιάτρηση [94, 95]

Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν ως στόχο τη προσωρινή διατάραξη του βακτηριακού τοιχώματος και της μεμβράνης με στόχο την εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού. Κατά την επώαση με διάλυμα $CaCl_2$ το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων αποκτά θετικό φορτίο με αποτέλεσμα το γενετικό υλικό που θέλουμε να εισάγουμε λόγω του αρνητικού του φορτίου να προσκολλάτε στην επιφάνειά του. Έπειτα λόγω του θερμικού σοκ θα προκληθεί χάλαση και τελικά εισαγωγή του επιθυμητού τμήματος DNA [96]. Κατά την ηλεκτροδιάτρηση από την άλλη, η σύντομη εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου στα βακτηριακά κύτταρα προκαλεί την παροδική δημιουργία πόρων, μέσω των οποίων το εξωγενές DNA εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο [96, 97].

3.3.1.1 Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (BL21 Gold (DE3), OverExpress C41 (DE3), OverExpress C43 (DE3)) με την χημική μέθοδο

Από το τριβλίο καλλιέργειας δεκτικών κυττάρων *E. coli* μία στικτή αποικία ενοφθαλμίζεται σε 10 mL υγρού θρεπτικού μέσου (στην παρούσα περίπτωση LB-Broth) που φέρει την κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού ανθεκτικότητας του κάθε βακτηριακού στελέχους, τα βακτήρια επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Έπειτα, ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε 200 mL υγρού θρεπτικού μέσου σε αναλογία 1:100 και η νέα υγρή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm (OD) να βρίσκεται εντός των τιμών 0,4-0,6 (σε αυτή την τιμή, θεωρείται πως τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους), τελικά η υγρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε πάγο για 14 λεπτά προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων. Με το πέρας της επώασης της υγρής καλλιέργειας στον πάγο, αυτή μεταφέρεται σε τέσσερις σωλήνες τύπου falcon όγκου 50 mL και ακολουθεί η φυγοκέντρωσή της σε 4000 g, για 6 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα τοποθετείται στον πάγο και σε κάθε σωλήνα προσθέτουμε σταδιακά 20 mL κρύου και αποστειρωμένου διαλύματος $CaCl_2$ συγκέντρωσης 100 mM. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με τη βοήθεια σιφωνίου, ενώ το εναιώρημα που προκύπτει αφήνεται στο πάγο για 20 λεπτά. Στη συνέχεια τα βακτήρια τοποθετούνται σε δύο σωλήνες τύπου

falcon και υποβάλλονται για φυγοκέντρηση σε 4000 *g*, για 6 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο από τους δύο σωλήνες απορρίπτεται και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με ήπια ανάδευση σε 1,6 *mL* (σε κάθε σωλήνα) κρύου και αποστειρωμένου διαλύματος *CaCl*₂ συγκέντρωσης 100 *mM*. Τα βακτήρια που εμπεριέχονται σε κάθε σωλήνα τοποθετούνται σε έναν νέο και αφήνονται σε πάγο για 16 ώρες. Τέλος, διάλυμα αποστειρωμένης γλυκερόλης 50% *v/v* προστίθεται στο βακτηριακό εναιώρημα ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 20% *v/v*, τα βακτήρια χωρίζονται σε κλάσματα των 100 μ L (σε σωλήνες τύπου *Eppendorf*), ψύχονται σε 100% αιθανόλη που βρίσκεται στους -80°C και αποθηκεύονται στους -80°C. Οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα μέσα και υλικά.

3.3.1.2 Μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (*BL21 Gold (DE3)*, *OverExpress C41 (DE3)*, *OverExpress C43 (DE3)*) με θερμικό σοκ.

Το βακτηριακό εναιώρημα επιδεκτικών κυττάρων, αφήνεται να ξεπαγώσει για 1-2 λεπτά στον πάγο. Αφού ξεπαγώσει, προστίθενται 1-50 *ng* πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο, ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε πάγο για 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών το βακτηριακό εναιώρημα τοποθετείται σε θερμοκρασία 42°C, για 45 δευτερόλεπτα, και τελικά μεταφέρεται ξανά σε πάγο για 2-3 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 0,9 *mL* αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου και επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 *rpm*) για μία ώρα. Τελικά 30-150 μ L εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων επιστρώνονται με τη χρήση πιπέτας *Pasteur* σε τριβλία *petri*, σε στερεό θρεπτικό μέσο *LB- Agar* που περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού ανθεκτικότητας των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων. Τα τριβλία επάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 16 ώρες. Οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα μέσα και υλικά.

3.3.2.1 Δημιουργία επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (BL21 Gold (DE3), OverExpress C41 (DE3), OverExpress C43 (DE3)) με ηλεκτροδιάτρηση.

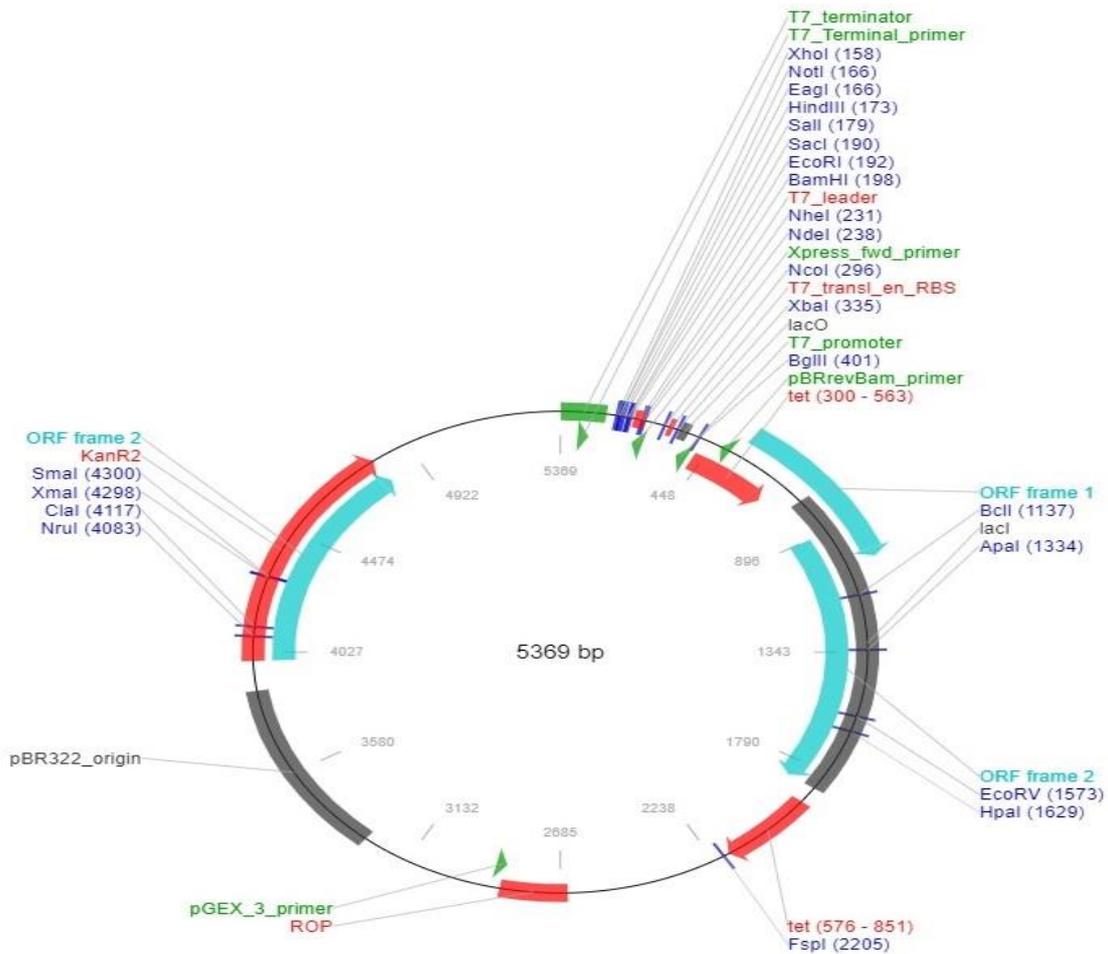
Από το τριβλίο καλλιέργειας δεκτικών κυττάρων *E. coli* μία σπικτή αποικία ενοφθαλμίζεται σε 10 mL υγρού θρεπτικού μέσου (στην παρούσα περίπτωση *LB-Broth*) που φέρει την κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού ανθεκτικότητας του κάθε βακτηριακού στελέχους, τα βακτήρια επωάζονται για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm). Έπειτα, ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε 200 mL υγρού θρεπτικού μέσου σε αναλογία 1:100 και η νέα υγρή καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *E. coli* επωάζεται στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) μέχρι η τιμή της οπτικής πυκνότητας (*OD*) σε μήκος κύματος 600 nm να έχει τιμή 0,4 (σε αυτή την τιμή, θεωρείται πως τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους), τελικά η υγρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε πάγο για 14 λεπτά προκειμένου να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων. Με το πέρας της επώασης της υγρής καλλιέργειας στο πάγο, μεταφέρεται σε τέσσερις σωλήνες τύπου *falcon* όγκου 50 mL και ακολουθεί φυγοκέντρωση της σε 4000 g, για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα τοποθετείται στο πάγο και σε κάθε σωλήνα προσθέτουμε σταδιακά 10 mL *WFI* (Water For Injection). Στη συνέχεια τα βακτήρια τοποθετούνται σε δύο σωλήνες και υποβάλλονται σε φυγοκέντρωση σε 4000 g, για 10 λεπτά στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο από τους δύο σωλήνες απορρίπτεται και τα βακτηριακά κύτταρα επαναδιαλυτοποιούνται με ήπια ανάδευση σε 10 mL *WFI* (σε κάθε σωλήνα). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για άλλη μία φορά. Τέλος, διάλυμα αποστειρωμένης γλυκερόλης 10% v/v προστίθεται στο ίζημα με τελικό όγκο 4 mL. Τα βακτήρια φυγοκεντρούνται ξανά σε 4000 g, για 10 λεπτά στους 4°C, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 250 μL γλυκερόλης 10% v/v. Τα βακτήρια χωρίζονται σε κλάσματα των 40 μL (σε σωλήνες τύπου *Eppendorf*), ψύχονται σε 100% αιθανόλη που βρίσκεται στους -80°C και αποθηκεύονται στους -80°C. Οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα μέσα και υλικά.

3.3.2.2 Μετασχηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli* (*BL21 Gold (DE3)*, *OverExpress C41 (DE3)*, *OverExpress C43 (DE3)*) με ηλεκτροδιάτρηση.

Το βακτηριακό εναιώρημα επιδεικτικών κυττάρων, αφήνεται να ξεπαγώσει για 1-2 λεπτά στον πάγο. Αφού ξεπαγώσει, προστίθενται 1-50 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο, ακολουθεί ηλεκτροδιάτρηση σε ειδική κυψελίδα. Έπειτα τα πλέον μετασχηματισμένα βακτήρια μεταφέρονται σε 0,96 mL αποστειρωμένου υγρού θρεπτικού μέσου και ακολουθεί επώασή τους σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) για μία ώρα. Τελικά 30-150 μ L εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων επιστρώνονται με την χρήση πιπέτας *Pasteur* σε τριβλία *petri*, με στερεό θρεπτικό μέσο *LB- Agar* που περιέχει την κατάλληλη συγκέντρωση αντιβιοτικού ανθεκτικότητας των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων. Τα τριβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 16 ώρες.

3.3.3 Δοκιμές έκφρασης της εγκεφαλικής ισομορφής της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (*HbGP*) παρουσία μοριακών συνοδών

Στη παρούσα διπλωματική εργασία το γονίδιο της ανθρώπινης φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGP*) βρίσκεται εντεθειμένο στο πλασμιδιακό φορέα *pET-28a* με δείκτη επιλογής το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη διαθέτει ετικέτα αχιστείας 6 ιστιδινών (*6x-His Tag*) στο *N*-τελικό της άκρο. Η ετικέτα αχιστείας μπορεί να απομακρυνθεί έπειτα από την πέψη του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου με την θρομβίνη καθώς ανάμεσά του παρεμβάλει η αλληλουχία αναγνώρισης της θρομβίνης (*G-L-V-P-R-G-S/ Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser*) [98]. Ωστόσο κρίθηκε πως εφόσον σκοπός ήταν η απομόνωση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης για την πραγματοποίηση κινητικών μελετών, δεν ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση της ετικέτας αχιστείας.



Εικόνα 3.3.3.α: Πλασμιδιακός χάρτης πλασμιδιακού φορέα κλωνοποίησης pET-28a.

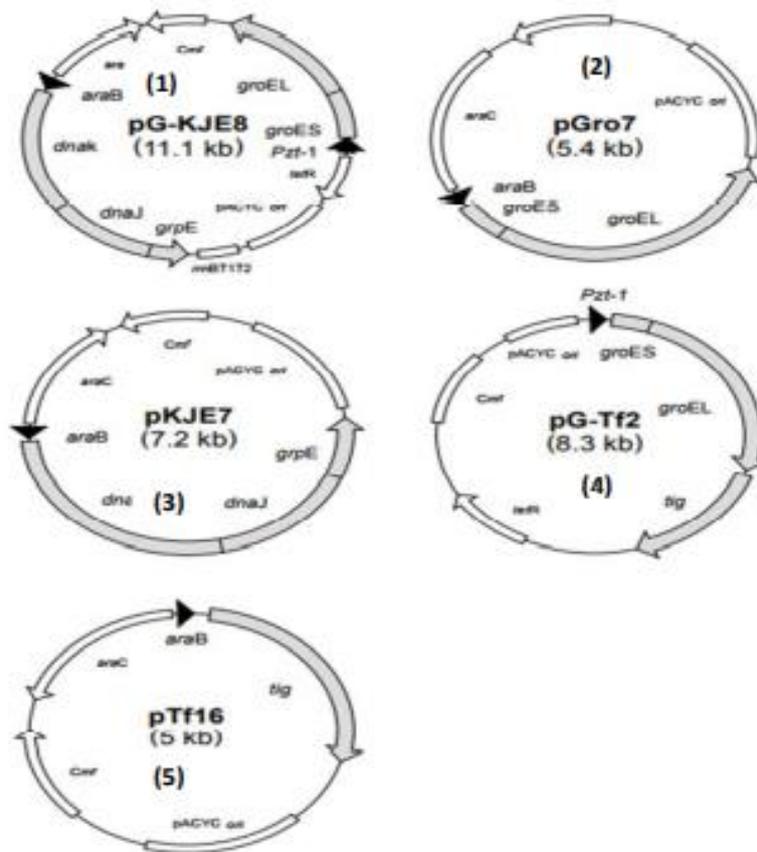
Ένα από τα κυριότερα συστήματα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι το βακτηριακό σύστημα *E. coli* από το οποίο έχει κατασκευαστεί μεγάλος αριθμός γενετικά τροποποιημένων στελεχών. Ο κυριότερος περιορισμός που προκύπτει κατά την ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι ότι είναι δυνατόν η πρωτεΐνη που θα προκύψει τελικά να μην έχει αναδιπλωθεί σωστά ή ακόμη να μην έχει αναδιπλωθεί καθόλου. Ωστόσο το πρόβλημα αυτό ξεπερνάται συνήθως με την συνέκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στόχου με άλλες πρωτεΐνες που ονομάζονται μοριακοί συνοδοί [99]. Οι μοριακές συνοδοί είναι μία κατηγορία πρωτεϊνών οι οποίες μέσα από διαδοχικούς κύκλους σύνδεσης και αποσύνδεσης με μία πρωτεΐνη και με την κατανάλωση ενέργειας (ATP) τη βοηθούν να αναδιπλωθεί σωστά, αποτρέποντας έτσι την κατακρήμνισή της [99].

Στην παρούσα διπλωματική εργασία λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ένα σετ πέντε πλασμιδίων της εταιρίας *Takara*, που κωδικοποιούν μοριακούς συνοδούς. Με τα

πλασμίδια αυτά μετασηματίστηκαν βακτηριακά κύτταρα *E. coli*, με την μέθοδο του θερμικού σοκ (στελέχη: *BL21 Gold (DE3)*, *OverExpress C41 (DE3)*, *OverExpress C43 (DE3)*) και ελέγχθηκε το πρότυπο έκφρασης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στόχου (*HbGP*). Τα βακτήρια τα οποία έχουν προσλάβει τα πλασμίδια των μοριακών συνοδών και στη συνέχεια μετασηματίζονται με ηλεκτροδιάτρηση.

No.	Πλασμίδιο	Μοριακοί Συνοδοί	Εκκινητής	Επαγωγέας	Δείκτης επιλογής (ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικό)
1	<i>pG-KJE8</i>	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i> <i>groES-groEL</i>	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-αραβινόζη Τετρακυκλίνη	Χλωραμφαινικόλη
2	<i>pGro7</i>	<i>groES-groEL</i>	<i>araB</i>	L-αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη
3	<i>pKJE7</i>	<i>dnaK-dnaJ-grpE</i>	<i>araB</i>	L-αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη
4	<i>pG-Tf2</i>	<i>groES-groEL-tig</i>	<i>araB</i>	Τετρακυκλίνη	Χλωραμφαινικόλη
5	<i>pTf16</i>	<i>tig</i>	<i>Pzt-1</i>	L-αραβινόζη	Χλωραμφαινικόλη

Πίνακας 3.3.3.α: Πλασμίδια που εμπεριέχονται στο σετ της εταιρίας *Takara* και χρησιμοποιήθηκαν στον έλεγχο των προτύπων έκφρασης της *HbGP* [100].



Εικόνα 3.3.3.β: Χάρτες των πλασμιδίων που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδούς [100].

Μοριακά βάρη μοριακών συνοδών (KDa)

<i>DnaK</i>	~ 70
<i>DnaJ</i>	~ 40
<i>GroES</i>	~ 10
<i>GroEL</i>	~ 60
<i>GrpE</i>	~ 22
<i>Tf</i>	~56

Πίνακας 3.3.3.β: Μοριακά βάρη μοριακών συνοδών [100].

Βακτηριακά κύτταρα *E coli* (σελέχη: *BL21 Gold (DE3)*, *OverExpress C41 (DE3)*, *OverExpress C43 (DE3)*) μετασχηματίζονται με ηλεκτροδιάτρηση όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.2.2. Από το βακτηριακό εναιώρημα το οποίο έχουμε επώσει σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm) σε υγρό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης *LB-Broth* όγκου 0,96 mL παρασκευάζονται αραιώσεις (1:10, 1:100, τα βακτήρια

αραιώνονται σε αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο *LB- Broth*) και επιστρώνονται σε τριβλία *petri* που περιέχουν στερεό θρεπτικό μέσο *LB- Agar* (τελικές συγκεντρώσεις: καναμυκίνη: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χλωραμφαινικόλη: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Τα τριβλία στη συνέχεια επωάζονται σε θερμαινόμενο κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C για 10-12 ώρες. Σε αυτό το σημείο σημειώνεται πως όλες οι διαδικασίες που περιλαμβάνουν χειρισμούς βακτηριακών κυττάρων και θρεπτικών μέσων πραγματοποιούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

Αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB-Broth* όγκου 20 mL που βρίσκεται σε σωλήνες τύπου *falcon* με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (τελικές συγκεντρώσεις: καναμυκίνη: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χλωραμφαινικόλη: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ενοφθαλμίζεται με μία στικτή αποικία από το κάθε τριβλίο στο οποίο έχουν αναπτυχθεί βακτήρια που έχουν μετασχηματιστεί με το κάθε πλασμίδιο που κωδικοποιεί μοριακές συνοδούς (no.1-5). Στις καλλιέργειες στις οποίες αναπτύσσονται τα βακτήρια που είναι μετασχηματισμένα με τα πλασμίδια 2, 3, 5 προστίθεται *L- αραβινόζη* σε τελική συγκέντρωση 0,15 mg/mL), ενώ αντίστοιχα για τα βακτήρια που είναι μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο 4 προστίθεται τετρακυκλίνη σε τελική συγκέντρωση 0,1 ng/mL), όσον αφορά τα βακτήρια που είναι μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο 1 σε αυτά προστίθενται και οι δύο επαγωγείς στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται παραπάνω. Η προσθήκη των επαγωγέων στις καλλιέργειες μικρής κλίμακας γίνεται με σκοπό την διευκόλυνση της ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων. Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 *rpm*) για 16 ώρες.

Με το πέρας των 16 ωρών σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό μέσο *LB- Broth* όγκου 50 mL (τελική συγκέντρωση αντιβιοτικών καναμυκίνη: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χλωραμφαινικόλη: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) μεταφέρεται ποσότητα από την υγρή καλλιέργεια που αναπτύχθηκε με αναλογία 1:100 (Πριν γίνει η μεταφορά των βακτηριακών κυττάρων στην νέα καλλιέργεια, κρατείται δείγμα του υγρού θρεπτικού μέσου ως μάρτυρα). Τα βακτηριακά κύτταρα στις νέες καλλιέργειες αφήνονται να αναπτυχθούν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 *rpm*) μέχρις ότου η τιμή οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 *nm* (*OD*) να φτάσει την τιμή 0,2-0,3 όπου και θα γίνει η προσθήκη των επαγωγέων κατά ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε και στη

παραπάνω παράγραφο. Τα βακτηριακά κύτταρα επανατοποθετούνται στον επωαστικό θάλαμο και αφήνονται να μεγαλώσουν μέχρι η OD_{600nm} να φτάσει τη τιμή 0,6-0,8 όπου και μετά τοποθετούνται σε πάγο για 30 λεπτά με σκοπό να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός τους και προστίθεται ο επαγωγέας του γονιδίου σε κατάλληλη τελική συγκέντρωση *IPTG* (0,5 mM). Η επαγωγή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 16°C υπό ανάδευση (210 rpm) *O/N* (*Over Night*). Μόλις ολοκληρωθεί η επαγωγή της υπερέκφρασης οι βακτηριακές καλλιέργειες φυγοκεντρώνται σε 5000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολουθεί κατεργασία των βακτηριακών κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (πίνακας: 3.3.3.β) και έπειτα υποβολή τους σε υπερηχοβόληση. Η έκθεση του κυτταρολύματος σε υπερήχους πραγματοποιείται για έναν κύκλο, με ένταση 70% για 5 δευτερόλεπτα, και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η πλήρης λύση των βακτηριακών κυττάρων και συνεπώς η απελευθέρωση του περιεχομένου τους. Το κυτταρόλυμα στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 17000 rpm, σε θερμοκρασία 4°C για 30 λεπτά και συλλέγονται δείγματα από το κυτταρόλυμα (*Total*), το διαλυτό κλάσμα (*Soluble*) και το ίζημα (*Pellet*). Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια αναλύονται σε πηκτή *SDS*- πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να παρατηρηθεί αν και σε ποιο κλάσμα εντοπίζεται η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη στόχος.

Διάλυμα λύσης ((Τελικός όγκος ($V_{\text{Τελ}}$)= 50 mL, pH= 8)

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
<i>Tris-HCl</i>	50 mM
<i>NaCl</i>	0,3 mM
<i>Triton X-100</i>	0,1%
<i>PMSF</i>	1 mM

Πίνακας 3.3.3.β: Σύσταση διαλύματος λύσης

3.3.4 Χρωματογραφία

3.3.4.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC)

Το πιο διαδεδομένο αυτοματοποιημένο σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών είναι η *ÄKTA FPLC (GE Healthcare)*. Στο σύστημα αυτό μεταφέρονται υγρά διαλύματα μέσω αντλιών θετικής μετατόπισης με την εφαρμογή υψηλής πίεσης. Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται είναι κατασκευασμένες σύμφωνα με το είδος της χρωματογραφίας που επιλέγεται (ιοντοανταλλαγής, συγγένειας, μοριακής διήθησης), με το υλικό πλήρωσής τους να είναι κάποιο πολυμερές (δεξτράνη, σεφαρόζη, ή αγαρόζη). Το υλικό πλήρωσης της στήλης αποτελεί τη στατική φάση, ενώ τα υγρά διαλύματα που διέρχονται από το σύστημα αυτό αποτελούν την κινητή φάση [101]. Στην εν λόγω διπλωματική εργασία, χρησιμοποιείται το σύστημα καθαρισμού πρωτεϊνών *Äkta Purifier UPC-900* που είναι τοποθετημένο σε ψυκτικό θάλαμο με θερμοκρασία 4°C. Επιπλέον το σύστημα διαθέτει συσκευή συλλογής κλασμάτων στην οποία τοποθετούνται δοκιμαστικοί σωλήνες των 5 mL και φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) που μετρά την οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 280 nm, μέσω του οποίου ελέγχεται σε πραγματικό χρόνο η περιεκτικότητα των κλασμάτων σε πρωτεΐνες. Ο έλεγχος των παραμέτρων καθαρισμού (διάλυμα, ροή, πίεση, όγκος κλασμάτων) ρυθμίζεται από το πρόγραμμα *UNICORN™*, ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε πειραματικής διαδικασίας. Όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που περνάνε μέσα από το σύστημα αυτό είναι υποχρεωτικά φιλτραρισμένα και απαερωμένα.

3.3.4.2 Αρχή της μεθόδου

Τα βασικά βήματα κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό μιας πρωτεΐνης είναι τα εξής:

- **Εξισορρόπηση (Equilibration)**: Κατά την εξισορρόπηση φροντίζουμε να περάσει από το σύστημα ένα συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο αποκαλείται *Buffer A* (ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης). Το διάλυμα αυτό συνήθως είναι το ίδιο ή έχει παρόμοια σύσταση με το διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων μέσα στα οποία εκφράζεται η

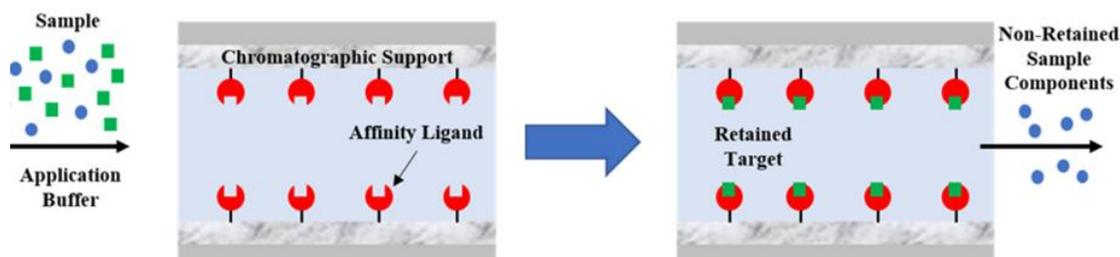
πρωτεΐνη που θέλουμε να απομονώσουμε. Φροντίζουμε να περάσουν από το σύστημα 5-10 όγκοι στήλης έτσι ώστε αφενός να απομακρυνθεί το διάλυμα με το οποίο είναι αποθηκευμένη η κάθε στήλη (συνήθως 20% αιθανόλη) αλλά και να εξομαλυνθεί το περιβάλλον από το οποίο θα διέλθει το δείγμα, ώστε να επιτευχθεί η αντιστρεπτή ομοιοπολική σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου σε αυτή. Σε αυτό το στάδιο θεωρείται πως δεν είναι προσδεμένο κάτι επάνω στη στήλη παρά μόνο ο ακινητοποιημένος συνδέτης. Η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm, μπορεί να παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις, γεγονός που οφείλεται συνήθως στα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης.

- **Εισαγωγή δείγματος (injection):** Σε αυτό το στάδιο το δείγμα (στην παρούσα διπλωματική εργασία βακτηριακό κυτταρόλυμα) εισέρχεται στη στήλη με σκοπό να γίνει η πρόσδεση ανάμεσα στη πρωτεΐνη στόχο και τα ακινητοποιημένα σωματίδια της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος τα οποία δεν έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης απομακρύνονται από το σύστημα (*Flow-Through*), ενώ παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης στα 280 nm, λόγω των πρωτεϊνών που δε καταφέρνουν να συνδεθούν ισχυρά στο προσδέτη της στήλης.
- **Πλύση (Wash):** Στη συνέχεια ακολουθεί σύντομη έκπλυση της στήλης με ένα διάλυμα που ονομάζεται διάλυμα έκπλυσης (*Wash Buffer*). Η έκπλυση της στήλης έχει ως στόχο να απομακρυνθούν πρωτεΐνες ή άλλα μόρια τα οποία δεν εμφανίζουν συγγένεια με τον προσδέτη και είναι ανεπιθύμητα. Η έκπλυση γίνεται συνήθως με 5-10 όγκους στήλης. Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται αύξηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm η οποία σταθεροποιείται, λόγω των ανεπιθύμητων πρωτεϊνών που διέρχονται από την συσκευή απορρόφησης του συστήματος.
- **Έκλυση (Elution):** Αυτό αποτελεί το τελευταίο στάδιο για την απομόνωση της επιθυμητής πρωτεΐνης σε υψηλή καθαρότητα. Υπάρχει η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί είτε εφαρμόζοντας βαθμίδωση συγκέντρωσης (*Gradient*) είτε δίδοντας εντολή στο σύστημα να χρησιμοποιήσει εξ'ολοκλήρου το ένα ρυθμιστικό διάλυμα που ονομάζεται διάλυμα έκλυσης (*Elution Buffer*). Η σύσταση του διαλύματος έκλυσης προτείνεται συνήθως από το εγχειρίδιο

οδηγιών που συνοδεύει τη κάθε χρωματογραφική στήλη. Κατά την έκλουση λοιπόν, η προσεδεμένη πρωτεΐνη στόχος απομακρύνεται από την στήλη και συλλέγεται σε κλάσματα υψηλής καθαρότητας. Το στάδιο αυτό έχει ως στόχο την τελική απομόνωση της πρωτεΐνης στόχου στη μέγιστη καθαρότητα [102].

3.3.4.3 Χρωματογραφία συγγένειας (*affinity chromatography*)

Η χρωματογραφία συγγένειας αποτελεί την πλέον συνήθη μέθοδο χρωματογραφικού καθαρισμού πρωτεϊνών. Η συγκεκριμένη τεχνική εκμεταλλεύεται τη δυνατότητα ισχυρής, αντιστρεπτής και εξαιρετικά επιλεκτικής σύνδεσης ανάμεσα σε ορισμένες χημικές ομάδες. Μερικά παραδείγματα τέτοιου είδους σύνδεσης αποτελούν: η σύνδεση ενός αντιγόνου με το ειδικό προς αυτό αντίσωμα, η σύνδεση ανάμεσα σε ένα ένζυμο και το υπόστρωμά του και η σύνδεση ανάμεσα σε μία ορμόνη με τον αντίστοιχο υποδοχέα της [103-107]. Στην εκάστοτε στήλη χρωματογραφίας πάνω στη στατική φάση είναι ακινητοποιημένο το ένα μέρος της σχέσης αυτής (συνδέτης), ενώ οι πρωτεΐνες οι οποίες επιθυμούμε να απομονώσουμε είναι ανασυνδυασμένες ώστε είτε στο *N*-τελικό, είτε στο *C*-τελικό τους άκρο να φέρουν το άλλο μέρος (ετικέτα αγκιστείας). Έτσι όταν πραγματοποιηθεί το εκάστοτε πρωτόκολλο απομόνωσης η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη συνδέεται ισχυρά στη στατική φάση της στήλης και οι υπόλοιπες απομακρύνονται. Η αποσύνδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στη συνέχεια πραγματοποιείται με τη μεταβολή των πειραματικών συνθηκών (*pH*, ιοντική ισχύς, ανταγωνιστικός προσδέτης) [108].



Εικόνα 3.3.4.3.α: Διάγραμμα απεικόνισης της αρχής μεθόδου της χρωματογραφίας συγγένειας (επεξεργασμένη [108]).

Στη παρούσα διπλωματική εργασία η επιθυμητή πρωτεΐνη *HbGP*, φέρει στο *N*-τελικό άκρο μία ετικέτα 6 ιστιδινών (*6x-His tag*) η οποία εμφανίζει συγγένεια με δισθενή

κατιόντα (Ni^{2+} , Co^{2+}), ο παράγοντας έκλυσης που χρησιμοποιείται είναι το ιμιδαζόλιο εξαιτίας της εξαιρετικής ομοιότητας που παρουσιάζει με τον δακτύλιο της ιστοιδίνης (*His*).

3.3.4.4 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (*Size Exclusion Chromatography*)

Ένας άλλος τρόπος πρωτεϊνικού διαχωρισμού είναι η χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Σε αυτόν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, το περιεχόμενο ενός δείγματος διαχωρίζεται με βάση το μοριακό του μέγεθος. Το προς ανάλυση δείγμα διέρχεται από μία στήλη η οποία περιέχει κόκκους από ένα αδιάλυτο πολυμερές που μπορεί να συγκρατήσει πολύ νερό (π.χ. δεξτράνη, αγαρόζη ή πολυακρυλαμίδα). Τυπικά η διάμετρος των πόρων των πολυμερών ανέρχεται στα 0,1 mm [6]. Ο πιο κοινός λόγος που χρησιμοποιείται είναι: ο διαχωρισμός ενός μίγματος πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος [109]. Καθώς ένα πρωτεϊνικό δείγμα διέρχεται από τη στήλη, πρωτεΐνες, μαζί με άλλα συστατικά του μίγματος ακολουθούν μια συγκεκριμένη διαδρομή λόγω του διαφορετικού τους μεγέθους, τα μεγαλύτερα μόρια βρίσκονται διαλυμένα στην υδατική φάση εκτός του πλέγματος που σχηματίζει το αδιάλυτο πολυμερές της στήλης, ενώ αντίθετα τα μικρότερα μόρια διαλύονται τόσο εντός όσο και εκτός της υδατικής φάσης του πλέγματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα μόρια μεγαλύτερου μεγέθους να εκλύονται πρώτα, λόγω της μικρής διαδρομής που διασχίζουν ενώ το αντίθετο ισχύει για τα μικρότερα μόρια [6].

3.3.5 Απομόνωση και καθαρισμός φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGP*)

Για την υπερέκφραση της *HbGP* χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα *E. coli* του στελέχους *OverExpress C41 (DE3)* προ-μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο *pGro7* (που κωδικοποιεί τις μοριακές συνοδούς *GroES-GroEL*). Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων με το πλασμιδιακό φορέα στον οποίο είναι εντεθειμένο το γονίδιο της *HbGP (pET-28a)* έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροδιάτρησης. Τα βακτήρια έχουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά καναμυκίνη (λόγω του *pET-28a*) και χλωραμφαινικόλη (λόγω του *pGro7*).

Από τριβλία με στερεό μέσο ανάπτυξης *LB-Agar* (τελική συγκέντρωση δεικτών επιλογής: καναμυκίνη: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χλωραμφαινικόλη: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$) επιλέχθηκε μία στικτή μοναδιαία αποικία με την οποία ενοφθαλμίστηκαν 100 mL υγρού θρεπτικού μέσου *LB- Broth* (τελική συγκέντρωση δεικτών επιλογής: καναμυκίνη: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χλωραμφαινικόλη: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και επαγωγέα *pGro7 L- αραβινόζη*: 0,15 mg/mL). Τα βακτήρια αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 *rpm*) για 16 ώρες. Με το πέρας των 16 ωρών ποσότητας της υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε νέα υγρή καλλιέργεια *LB- Broth* 4L (τα 4L υγρού θρεπτικού μέσου ήταν ισόποσα κατανεμημένα σε 4 κωνικές φιάλες όγκου 2L) με αναλογία 1:100 (τελική συγκέντρωση δεικτών επιλογής: καναμυκίνη: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, χλωραμφαινικόλη: 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Πριν γίνει ο ενοφθαλμισμός της υγρής καλλιέργειας *LB- Broth* κρατήθηκε 1 mL ως μάρτυρας με σκοπό τον έλεγχο της ανάπτυξης των βακτηριακών κυττάρων στην υγρή καλλιέργεια, μετρώντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm. Οι υγρές καλλιέργειες βακτηρίων αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 *rpm*). Όταν η τιμή της οπτικής τους πυκνότητας στα 600 nm βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές 0,2-0,3 γίνεται η προσθήκη του επαγωγέα των μοριακών συνοδών (*L- αραβινόζη*: 0,15 mg/mL). Μόλις τα βακτήρια αναπτυχθούν επαρκώς ($OD_{600\text{nm}} = 0,6-0,8$) οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται σε πάγο για χρονικό διάστημα 20 λεπτών με σκοπό να σταματήσει ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων και να γίνει η επαγωγή της υπερέκφρασης της *HbGP* (τελική συγκέντρωση *IPTG* = 0,5 mM). Η επαγωγή πραγματοποιείται μετά την προσθήκη του επαγωγέα σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 16°C υπό ανάδευση (210 *rpm*) *O/N*. Μόλις ολοκληρωθεί η υπερέκφραση τα βακτηριακά κύτταρα συλλέγονται με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις σε δοχεία όγκου 500 mL (*corex*) σε θερμοκρασία 4°C, 5000 *rpm* για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και κρατείται το ίζημα. Το ίζημα στη συνέχεια διαλυτοποιείται σε διάλυμα λύσης (πίνακας: 3.3.3.β), το *PMSF*, που αποτελεί αναστολέα πρωτεασών σερίνης τοποθετείται ακριβώς πριν λύση των κυττάρων λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής που διαθέτει. Η διαλυτοποίηση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιείται με ήπια ανάδευση (*up-down*), μέσα σε πάγο και μόλις αυτή ολοκληρωθεί στο κυτταρόλυμα προστίθεται 1 μL βενζονάσης (νουκλεάση), παρουσία της οποίας το κυτταρόλυμα επωάζεται για 10 λεπτά. Με το πέρας της

επώσης τα βακτηριακά κύτταρα διαλυτοποιούνται σε συσκευή υπερήχων σε 6 κύκλους διάρκειας 1 λεπτού (30 δευτερόλεπτα **ON**, 30 δευτερόλεπτα **OFF**) με ένταση (*Amplitude*): 70%. Μετά την πλήρη λύση των κυττάρων, το πλέον πλήρως διαλυτοποιημένο κυτταρόλυμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C, 15000 rpm για 1 ώρα και 30 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο φιλτράρεται με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm και αφήνεται σε πάγο. Η απομόνωση της HbGP πραγματοποιείται σε δύο στάδια με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος *ÄKTA FPLC*.

1^ο Βήμα καθαρισμού: HiTrap TALON crude (ακίνητοποιημένα ιόντα Co²⁺ σε σφαιρίδια σεφαρόζης)

Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα εξισορρόπησης (πίνακας 3.3.5.α). Από τη στήλη περνάνε τουλάχιστον 10 όγκοι με ροή 0,5 mL/min. Εισάγεται το δείγμα και η ροή με το οποίο τροφοδοτείται στο σύστημα ορίζεται ως 0,3 mL/min. Τα κλάσματα που συλλέγονται σε αυτό το στάδιο έχουν όγκο 5 mL. Η πλύση της στήλης έγινε με το διάλυμα έκπλυσης (πίνακας 3.3.5.β) για περίπου 10 όγκους στήλης μέχρι η απορρόφηση στα 280 nm να προσεγγίσει το 0, η ροή ρυθμίστηκε στα 1 mL/min, τα κλάσματα που συλλέχθηκαν είχαν όγκο 5 mL. Τέλος, η έκπλυση πραγματοποιήθηκε και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1 mL. Όταν η απορρόφηση στα 280 nm προσεγγίσει το 0 τότε ρυθμίζουμε στο σύστημα να διοχετεύει μόνο από την αντλία Β (500 mM ιμιδαζολίου). Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες προκειμένου να διαπιστωθεί ποια κλάσματα περιέχουν την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σε μεγαλύτερη καθαρότητα.

Διάλυμα Εξισορρόπησης pH= 8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
Tris	50 mM
NaCl	0,3 mM
Triton X-100	0,1 %

Ιμιδαζόλιο	10 mM
-------------------	--------------

Πίνακας 3.3.5.α: Σύσταση διαλύματος εξισορρόπησης

Διάλυμα έκπλυσης pH= 8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
<i>Tris</i>	50 mM
<i>NaCl</i>	0,3 mM
<i>Triton X-100</i>	0,1 %
Ιμιδαζόλιο	20 mM

Πίνακας 3.3.5.β: Σύσταση διαλύματος έκπλυσης

Διάλυμα έκλουσης pH= 8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
<i>Tris</i>	50 mM
<i>NaCl</i>	0,3 mM
<i>Triton X-100</i>	0,1 %
Ιμιδαζόλιο	500 mM

Πίνακας 3.3.5.γ: Σύσταση διαλύματος έκλουσης

Τα κλάσματα στα οποία εντοπίζεται η πρωτεΐνη σε επιθυμητή καθαρότητα ενώνονται και υποβάλλονται σε διαπίδυση με διάλυμα 50:50:1.

Διάλυμα 50:50:1 pH= 6,8

Αντιδραστήριο	Συγκέντρωση
β -GP	50 mM
β - Μερκαπτοαιθανόλη	50 mM
<i>EDTA</i>	1 mM

Πίνακας 3.3.5.δ: Σύσταση διαλύματος 50:50:1

2^ο Βήμα καθαρισμού: Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Superdex S200.

Η εξισορρόπηση της στήλης πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα 50:50:1 για 1 όγκο στήλης (120 mL), το δείγμα εισήχθη στο σύστημα με ροή 0,5 mL/min. Τα κλάσματα που συλλέγονται σε αυτό το στάδιο έχουν όγκο 1 mL, και με σκοπό τον εντοπισμό της πρωτεΐνης αναλύονται σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες και υποβάλλονται σε συμπύκνωση με κατώφλι φίλτρου 30 KDa.

3.3.6 Φωσφορυλίωση HbGP

Η φωσφορυλίωση της HbGP, βάση βιβλιογραφίας πραγματοποιήθηκε από την *rmPhkγ* [30]. Η φωσφορυλίωση της HbGP στην *Ser₁₄* έγινε προκειμένου να αξιολογηθεί η δραστικότητα του ενζύμου στην φωσφορυλιωμένη (HbGP_a) καθώς και στη μη φωσφορυλιωμένη μορφή (HbGP_b) του. Η διαδικασία της φωσφορυλίωσης έλαβε χώρα μετά τον καθαρισμό της HbGP, με τη στήλη *HiTrap TALON crude*. Το πρωτεϊνικό διάλυμα που προέκυψε ήταν αρκετά υψηλής καθαρότητας και για αυτόν το λόγο μετά την διαπίδυση η μισή ποσότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος αποθηκεύτηκε με 50% v/v γλυκερόλη στους -20°C για μετέπειτα μελέτες (HbGP_b). Η φωσφορυλίωση της HbGP γίνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (πίνακας 3.3.6.α), παρουσία 2 mM ATP, 10 ng/mL *rmPhkγ-trunc* και 0,5 mg/mL HbGP. Η *rmPhkγ-trunc* είναι αραιωμένη σε συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα (πίνακας 3.3.6.α). Στην αντίδραση προστίθεται η BSA σε συγκέντρωση 5 mg/mL προκειμένου να μη προσκολληθεί το ένζυμο στα τοιχώματα του σωλήνα. Η αντίδραση ξεκινάει με τη προσθήκη του ATP, στο προς φωσφορυλίωση πρωτεϊνικό διάλυμα το οποίο επωάζεται για 1 ώρα και 30 λεπτά σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C. Με το πέρας της αντίδρασης η διαδικασία διακόπτεται με τη προσθήκη του πρωτεϊνικού διαλύματος στο πάγο.

Ρυθμιστικό Διάλυμα (pH= 8,2)

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
<i>Tris-HCl</i>	50 mM
<i>Hepes</i>	50 mM

CaCl₂	0,5 M
DTT	2 mM
(CH₃COO)₂Mg	10 mM

Πίνακας 3.3.6.α: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορυλίωσης

Τα τρέχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση της *HbGP* δεν επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο τη δραστηριότητα της όπως στην περίπτωση της μυϊκής ισομορφής [31] καθώς θεωρείται ότι η ενεργοποίηση της *HbGP* γίνεται κατά κύριο λόγο από την αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της *AMP*, για αυτόν τον λόγω πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της σταθεράς *Michaelis-Menten* (K_m), τόσο στην *HbGP*_a όσο και την *HbGP*_b, παρουσία και απουσία *AMP*.

3.3.7 Υπολογισμός σταθεράς *Michaelis-Menten* (K_m)

Το ενζυμικό διάλυμα παρασκευάζεται με την αραιώση του ενζυμικού εναιωρήματος σε διάλυμα 50:50:1. Το ενζυμικό διάλυμα έχει σύσταση: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *HbGP*, 0,2% w/v γλυκογόνο, 5% διάλυμα v/v 50:50:1. Σε άλλους δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζονται τα υποστρώματα της *G1P* με τελικές συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6, 10 mM. Η παρασκευή γίνεται με την προσθήκη 40 μL υποστρώματος *G1P* συγκέντρωσης 4,5-45 mM, 7,2 μL *AMP* 25 mM και 96,8 μL *dH₂O* (για το κάθε διάλυμα υποστρώματος).

Η διαδικασία ξεκινάει με την επώαση του ενζυμικού διαλύματος σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για 15 λεπτά και των διαλυμάτων των υποστρωμάτων για 3 λεπτά. Με την ολοκλήρωση της επώασης 36 μL του ενζυμικού διαλύματος τοποθετούνται σε κάθε σωλήνα με διαφορετική συγκέντρωση υποστρώματος ώστε να ξεκινήσει η αντίδραση. Οι τελικές συνθήκες της αντίδρασης έχουν ως εξής: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *HbGP*, 1 mM *AMP*, 0,2% w/v γλυκογόνο και *G1P* 1-10, η θερμοκρασία είναι 30°C και το pH 6,8. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (ανά 5 λεπτά) λαμβάνεται δείγμα 40 μL που μεταφέρετε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10 μL *SDS* (1% w/v), με σκοπό να γίνει παύση της αντίδρασης.

Τα αποτελέσματα προκύπτουν έπειτα από το φωτομετρικό προσδιορισμό των ορθοφωσφορικών ιόντων μετά την επώαση του δείγματος με διάλυμα που αποτελεί μίγμα ασκορβικού οξέος-μολυβδαινικού αμμωνίου/ οξικού ψευδαργύρου (η διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο: 3.3.9). Παρασκευάζονται τυφλά διαλύματα, της *G1P*, λόγω της φυσικής της υδρόλυσης, του ενζυμικού διαλύματος, νερού και ορθοφωσφορικών ιόντων (*Pi*).

3.3.8 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας

Η ειδική δραστηριότητα ορίζεται ως τα μmol υποστρώματος που καταναλώνονται ή προϊόντος που παράγονται ανά μονάδα χρόνου για κάθε mg πρωτεΐνης. Για τον προσδιορισμό της ειδικής δραστηριότητας στην παρούσα διπλωματική πορεία μελετήθηκε η αντίστροφη αντίδραση που καταλύει το ένζυμο, δηλαδή όχι η φωσφορόλυση αλλά η αντίδραση σύνδεσης *G1P* στο μακρομόριο του γλυκογόνου με τη ταυτόχρονη απελευθέρωση φωσφορικών ιόντων (*Pi*). Τα ορθοφωσφορικά ιόντα έχουν τη δυνατότητα κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες να σχηματίζουν χρωμοφόρα σύμπλοκα, που απορροφούν σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (η διαδικασία περιγράφεται στην παράγραφο: 3.3.9).

3.3.9 Μέθοδος ασκορβικού οξέος

Σε ήπιο όξινο περιβάλλον, παρουσία οξικού ψευδαργύρου σχηματίζεται μία έγχρωμη ετεροπολυμεταλλική ένωση η οποία ανάγεται με ασκορβικό οξύ και απορροφά σε μήκος κύματος 850 nm . Παρασκευάζεται μίγμα διαλύματος 15 mM μολυβδαινικού αμμωνίου και 100 mM οξικού ψευδαργύρου ($\text{pH } 5$, η ρύθμιση γίνεται με HCl) και διάλυμα ασκορβικού οξέος $10\% \text{ w/v}$ ($\text{pH } 5$, η ρύθμιση γίνεται με NaOH). Τα διαλύματα αυτά αναμιγνύονται σε αναλογία 4:1 (διάλυμα οξικού ψευδαργύρου/ μολυβδαινικού αμμωνίου: διάλυμα ασκορβικού) σε αδιαφανές σκούρο δοχείο. Με το πέρας της ανάμιξης, το μίγμα επώαζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστεί η έγχρωμη ένωση. Έπειτα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρεται ποσότητα του διαλύματος, γίνεται ανάδευση σε *vortex*, και τα προς μελέτη δείγματα επώαζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 30°C σε υδατόλουτρο. Τα ορθοφωσφορικά ιόντα που απελευθερώνονται από τη *G1P* κατά τη διάρκεια της

αντίδρασης, σχηματίζουν σύμπλοκο με το μολυβδαινικό αμμώνιο παρουσία Zn^{2+} το οποίο έπειτα ανάγεται από το ασκορβικό οξύ με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός χρωμοφόρου που εμφανίζει απορρόφηση σε μήκος κύματος 850 nm [110].

Στα δείγματα συνολικού όγκου $50\text{ }\mu\text{L}$ που προκύπτουν από το κινητικό πείραμα προστίθενται $500\text{ }\mu\text{L}$ από το μίγμα προσδιορισμού των ορθοφωσφορικών ιόντων, ακολουθεί ανακίνηση σε *vortex* και επώαση των δοκιμαστικών σωλήνων σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 30°C για χρονικό διάστημα 15 λεπτών. Με το πέρας της επώασης τα δείγματα φωτομετρούνται σε μήκος κύματος 850 nm .

3.3.10 Προσδιορισμός IC_{50} αναστολέα

Η ύπαρξη αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης μειώνει την ταχύτητα με την οποία συντίθεται το γλυκογόνο και απελευθερώνονται τα ορθοφωσφορικά ιόντα. Η μείωση της ταχύτητας λοιπόν εκφράζεται ως αναστολή σύμφωνα με τα τρέχοντα μοντέλα ενζυμικής αναστολής [110].

Για να προσδιοριστεί η σταθερά θα πρέπει να γίνει κινητική μελέτη του ενζύμου παρουσία αναστολέα σε συγκέντρωση εκατέρωθεν την περιοχής IC_{50} για συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος ($G1P$). Η IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά 50% σε συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος. Για τον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50} προσδιορίζονται οι ειδικές δραστηριότητες απουσία και παρουσία αναστολέα, και η σταθερά εκφράζεται ως επί τοις εκατό αναστολή σε σχέση με την ειδική δραστηριότητα απουσία αναστολέα. Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι ο εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{s.a \text{ control} - s.a.i}{s.a \text{ control}} \times 100\%$$

Όπου:

- $s.a_{control}$: ειδική δραστηριότητα ενζύμου, απουσία αναστολέα
- $s.a_i$: ειδική δραστηριότητα ενζύμου, παρουσία αναστολέα (i)
- s : Κλίση

Επομένως η σταθερά IC_{50} υπολογίζεται με βάση τη σχέση: $y = 100\% / 1 + (x / IC_{50})^S$

Τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται πρέπει να έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις αναστολέα, εκατέρωθεν της σταθεράς IC_{50} . Η συγκέντρωση της $G1P$ είναι σταθερή (1 mM), της AMP 1 mM και του $DMSO$ 2% v/v (πίνακας 3.3.10.α). Σε κάθε πείραμα έχουμε μια συνθήκη στην οποία απουσιάζει ο αναστολέας.

	Διάλυμα παρουσία αναστολέα	Διάλυμα δίχως αναστολέα
<i>G1P</i>	40 μL	40 μL
<i>AMP</i>	7,8 μL	7,8 μL
Αναστολέας	-	3,6 μL
<i>DMSO</i>	3,6 μL	-
<i>dH₂O</i>	93,6 μL	93,6 μL
Τελικός όγκος (V_{TEL})	144 μL	144 μL

Πίνακας 3.3.10.α: Σύσταση διαλυμάτων για τον προσδιορισμό της σταθεράς IC_{50}

3.3.11 Ανάλυση κινητικών δεδομένων

Τα κινητικά δεδομένα επεξεργάστηκαν με σκοπό τη δημιουργία των απαραίτητων διαγραμμάτων αλλά και τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων (K_m , V_{max} , IC_{50}) και της ειδικής δραστηριότητας του ενζύμου με το υπολογιστικό πρόγραμμα *GraFit* [111].

Οι απορροφήσεις των δειγμάτων σε μήκος κύματος 850 nm αφού κανονικοποιηθούν, ως προς την απορρόφηση της $G1P$ και των ορθοφωσφορικών ιόντων που εντοπίζονται στο διάλυμα, μετατρέπονται σε μmol ορθοφωσφορικών ιόντων σύμφωνα με μία πρότυπη καμπύλη. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε με την φωτομέτρηση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματος ορθοφωσφορικών ιόντων. Σε ένα διάλυμα ορθοφωσφορικών ιόντων 1 mM και όγκου 40 μL υπάρχουν 0,04 μmol ορθοφωσφορικών. Έστω ότι το τυφλό διάλυμα παρουσιάζει απορρόφηση A , τότε η απορρόφηση αυτή δηλώνει την παρουσία 0,04 μmol ορθοφωσφορικών ιόντων. Έτσι υπολογίζεται η ποσότητα τους σε μmol για κάθε δείγμα.

Η εξίσωση *Michaelis-Menten* χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της σταθεράς K_m .

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Όπου:

- V : ταχύτητα αντίδρασης
- V_{max} : Μέγιστη ταχύτητα αντίδρασης
- $[S]$: Συγκέντρωση προϊόντος
- K_m : Σταθερά *Michaelis- Menten*.

Η συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία αντιστοιχεί το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας υπολογίζεται από την καμπύλη με μορφή κορεσμού $V = f([S])$.

4. Αποτελέσματα

4.1 Δοκιμές έκφρασης της *HbGP* παρουσία μοριακών συνοδών

Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία παρατηρήθηκε ότι ο μόνος τρόπος με τον οποίο είχε επιτευχθεί έκφραση της *HbGP* σε ικανοποιητικά επίπεδα στο βακτηριακό σύστημα *E. coli* ήταν μέσω της συν-έκφρασης της με μοριακούς συνοδούς. Στη παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν δοκιμές έκφρασης της *HbGP*, παρουσία μοριακών συνοδών (που περιέχονται στο σετ πλασμιδίων της εταιρίας *Takara*) σε διαφορετικά βακτηριακά στελέχη της *E. coli* (*BL21-Gold (DE3)*, *OverExpress C41 (DE3)* και *OverExpress C43 (DE3)*).

Για λόγους ευκολίας τα πλασμίδια των μοριακών συνοδών αναφέρονται αριθμητικά (π.χ. *pG-KJE8* αποκαλείται ως πλασμίδιο 1 κ.ο.κ.).

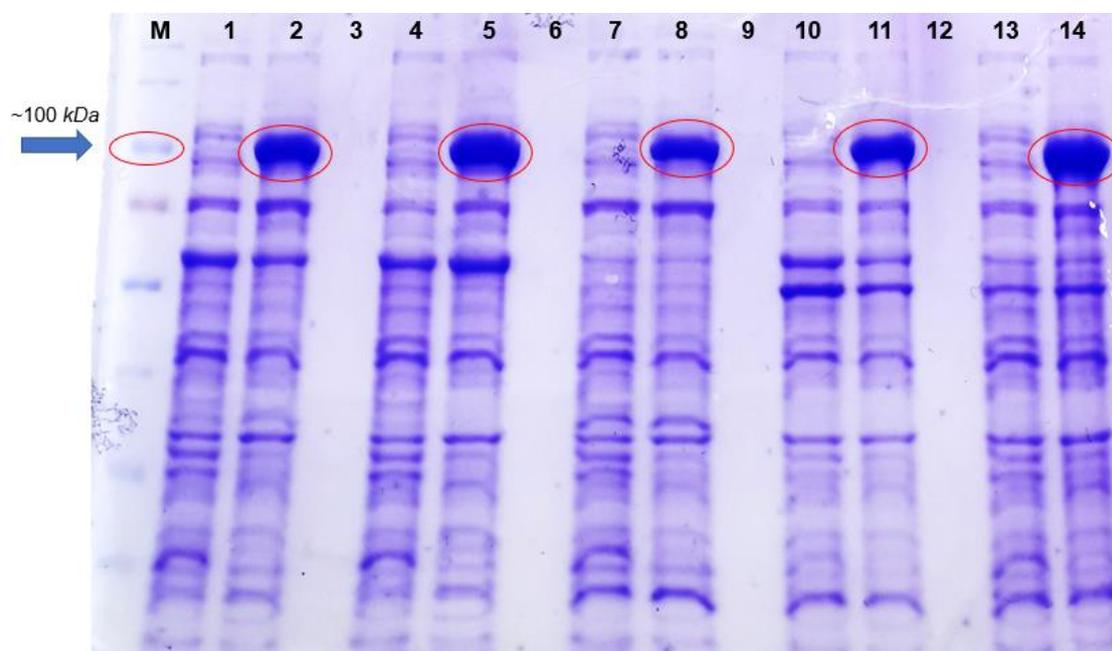
No.	Πλασμίδιο
1	<i>pG-KJE8</i>
2	<i>pGro7</i>
3	<i>pKJE7</i>
4	<i>pG-Tf2</i>
5	<i>pTf16</i>

Πίνακας 4.1.α: Αρίθμηση πλασμιδίων μοριακών συνοδών

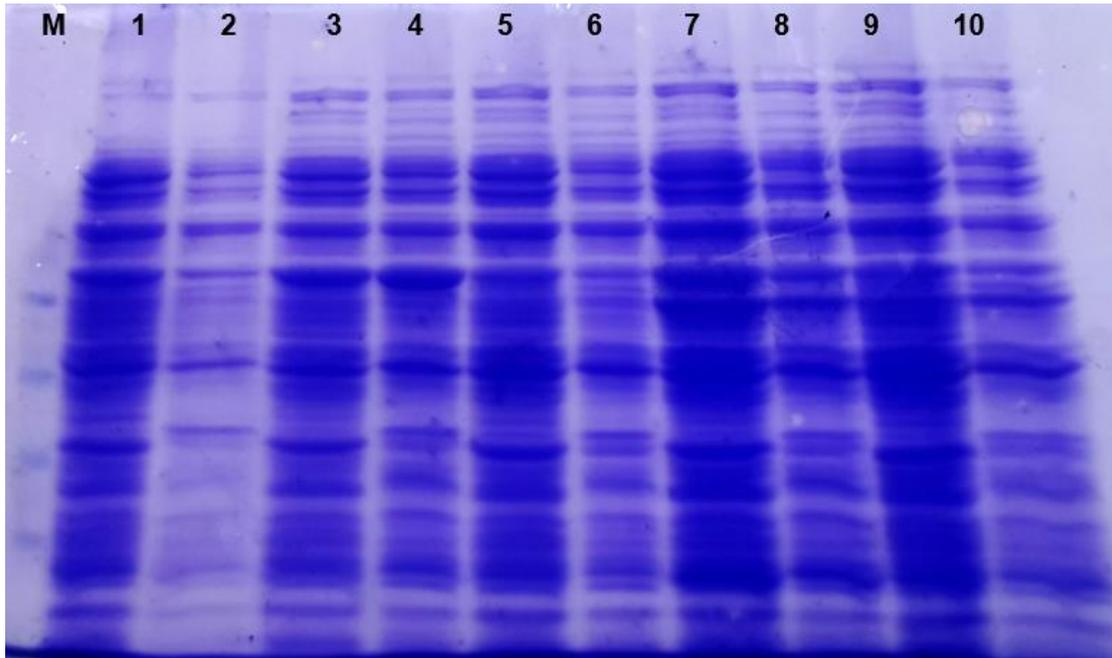
Δοκιμές έκφρασης *HbGP* στο στέλεχος *BL21-Gold (DE3)*:

Αρχικά, το πλασμίδιο της *HbGP* εισήχθη με ηλεκτροδιάτρηση σε βακτηριακά κύτταρα *E. coli BL21-Gold (DE3)* που είχαν προηγουμένως μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικεύουν τις μοριακές συνοδούς. Στις εικόνες των πηκτών *SDS*-πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές παρακάτω φαίνεται η απουσία έκφρασης της *HbGP* στο διαλυτό μέρος. Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων έγινε σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C υπό ανάδευση (210 rpm), όταν η οπτική πυκνότητα σε μήκος κύματος 600 nm (*OD_{600nm}*) βρέθηκε ανάμεσα στις τιμές 0,2-0,3 έγινε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας των επαγωγέων των γονιδίων των μοριακών συνοδών (στα πλασμίδια 1, 2, 3, και 5 προστέθηκε *L*-αραβινόζη σε τελική συγκέντρωση 0,15 mg/mL, ενώ στα πλασμίδια 1 και 4 προστέθηκε τετρακυκλίνη σε

τελική συγκέντρωση 10 ng/mL) και στη συνέχεια τα βακτήρια αφέθηκαν να αναπτυχθούν στις ίδιες συνθήκες μέχρι η $OD_{600nm} = 0,6-0,8$. Στη συνέχεια αφού αφέθηκαν για 20 λεπτά σε πάγο, τελικώς έγινε η προσθήκη του επαγωγέα IPTG σε συγκέντρωση 0,5 mM. Ακολούθησε επαγωγή της υπερέκφρασης σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 16°C υπό ανάδευση (210 rpm) O/N. Παράλληλα αναπτύχθηκαν και άλλες βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες δε πραγματοποιήθηκε επαγωγή του γονιδίου της HbGP (control). Μετά την υπερέκφραση ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάλυση δειγμάτων που προήλθαν από διαφορετικά κλάσματα σε πηκτή SDS- πολυακρυλαμίδης (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες.



Εικόνα 4.1.α: Ανάλυση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης (10%) του αδιάλυτου μέρους (Total). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους βρίσκεται στη διαδρομή που έχει σημειωθεί ως M. Κάθε διαδρομή έχει αριθμηθεί κατά αύξοντα αριθμό και αντιστοιχεί σε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδούς. 1: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (- IPTG), 2: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (+ IPTG), 4: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (- IPTG), 5: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (+ IPTG), 7: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (- IPTG), 8: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (+ IPTG), 10: Πλασμίδιο *pG-Tf2* (4) (- IPTG), 11: Πλασμίδιο *pG-Tf2* (4) (+ IPTG), 13: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (- IPTG), 14: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (+ IPTG). Μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην HbGP: 98,8 kDa.

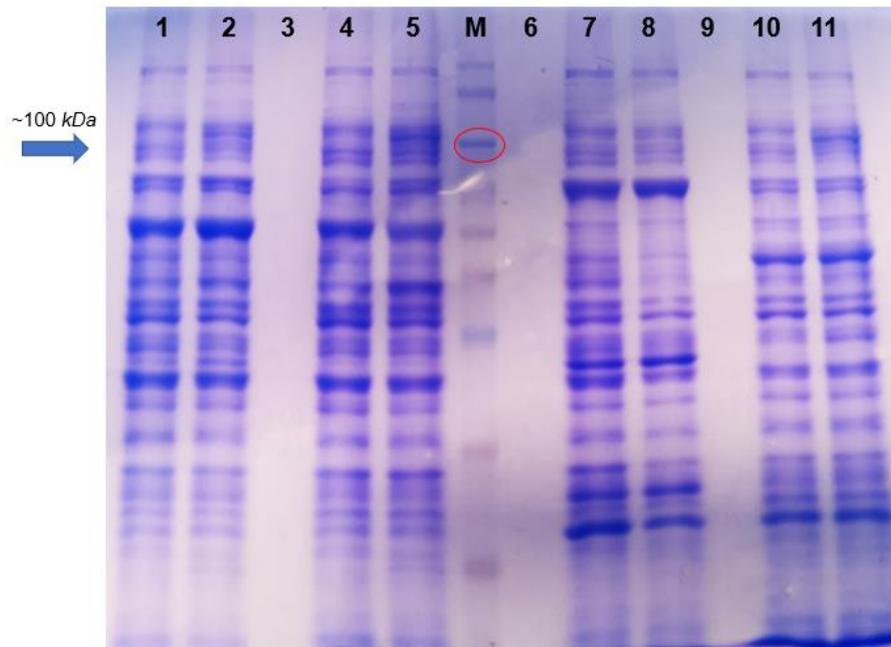


Εικόνα 4.1.β: Ανάλυση πηκτής SDS- πολυακρυλαμίδης (10%) του διαλυτού μέρους (*Soluble*). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους βρίσκεται στην διαδρομή που έχει σημανθεί ως *M*. Κάθε διαδρομή έχει αριθμηθεί κατά αύξοντα αριθμό και αντιστοιχεί σε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδού. 1: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (- *IPTG*), 2: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (+ *IPTG*), 4: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (- *IPTG*), 5: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (+ *IPTG*), 7: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (- *IPTG*), 8: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (+ *IPTG*), 10: Πλασμίδιο *pG-Tf2* (4) (- *IPTG*), 11: Πλασμίδιο *pG-Tf2* (4) (+ *IPTG*), 13: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (- *IPTG*), 14: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (+ *IPTG*). Μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην *HbGP*: 98,8 *KDa*.

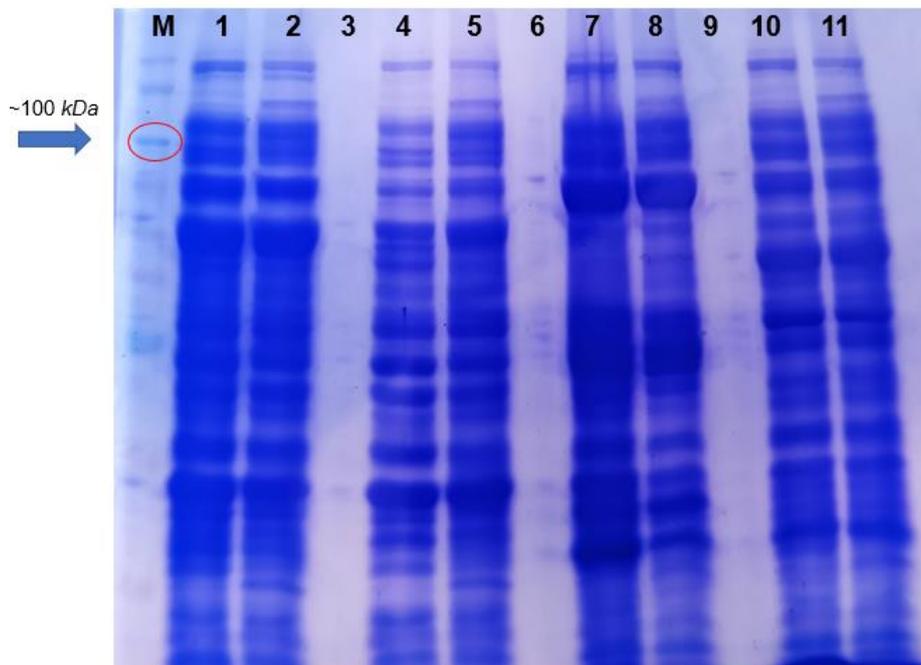
Στις παραπάνω εικόνες είναι διακριτό πως η πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται στο διαλυτό μέρος, για αυτό το λόγο ακολούθησε προσπάθεια έκφρασης της *HbGP* σε άλλο κυτταρικό στέλεχος της *E. Coli*, το *OverExpress C43 (DE3)*. Το στέλεχος αυτό έχει προέλθει από τα *BL-21 Gold (DE3)* και χρησιμοποιείται ευρέως για την έκφραση τοξικών πρωτεϊνών [112].

Δοκιμές έκφρασης *HbGP* στο στέλεχος *OverExpress C43 (DE3)*:

Όλα τα βήματα που οδηγούσαν στην έκφραση (μετασηματισμός, υγρές καλλιέργειες, επαγωγή) αλλά και αυτά της επεξεργασίας των δειγμάτων έγιναν με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε και στο παραπάνω εδάφιο. Τα αποτελέσματα των πηκτών SDS-πολυακρυλαμίδης (10%) απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 4.1.γ: Ανάλυση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης (10%) του αδιάλυτου μέρους (*Total*). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους βρίσκεται στη διαδρομή που έχει σημανθεί ως *M*. Κάθε διαδρομή έχει αριθμηθεί κατά αύξοντα αριθμό και αντιστοιχεί σε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνόδου. 1: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (- *IPTG*), 2: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (+ *IPTG*), 4: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (- *IPTG*), 5: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (+ *IPTG*), 7: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (- *IPTG*), 8: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (+ *IPTG*), 10: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (- *IPTG*), 11: Πλασμίδιο *pTf 16* (5) (+ *IPTG*).Μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην *HbGP*: 98,8 *KDa*.



Εικόνα 4.1.δ: Ανάλυση πηκτής SDS-πολυακρυλαμίδης (10%) του διαλυτού μέρους (*Soluble*). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους βρίσκεται στην διαδρομή που έχει σημανθεί ως *M*. Κάθε διαδρομή έχει αριθμηθεί κατά αύξοντα αριθμό

και αντιστοιχεί σε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδούς. 1: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (- IPTG), 2: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (+ IPTG), 4: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (- IPTG), 5: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (+ IPTG), 7: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (- IPTG), 8: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (+ IPTG), 10: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (- IPTG), 11: Πλασμίδιο *pTf 16* (5) (+ IPTG). Μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην *HbGP*: 98,8 *KDa*.

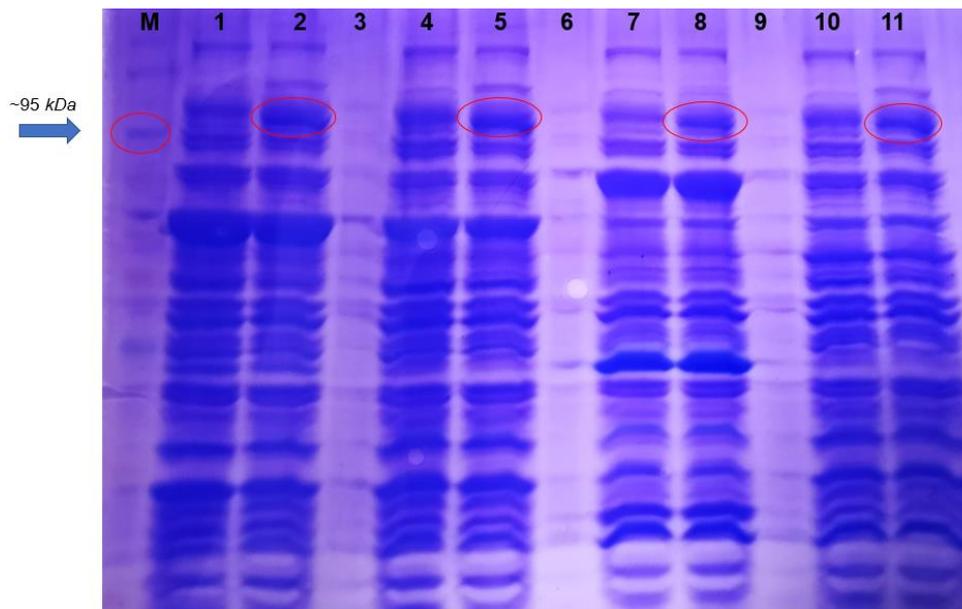
Στις παραπάνω πηκτές παρατηρούμε πως η έκφραση της *HbGP* απουσιάζει τόσο από το διαλυτό όσο και από το αδιάλυτο κλάσμα καθώς επίσης παρατηρούμε ότι τα βακτηριακά κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με το πλασμίδιο 4 (*pG-Tf2*) δεν αναπτύχθηκαν αρκετά ώστε να προχωρήσουμε σε επαγωγή της υπερέκφρασης.

Οι παραπάνω αναλύσεις οδήγησαν στην ανάγκη εύρεσης προς χρήση ενός άλλου βακτηριακού στελέχους της *E. coli*. Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ήταν το *OverExpress C41 (DE3)*. Τα στελέχη *OverExpress C41 (DE3)* και *OverExpress C43 (DE3)* προέρχονται από το *BL21-Gold (DE3)* με το πρώτο να διαθέτει 7 γονιδιακές μεταλλάξεις και το δεύτερο 12 σε σχέση με το μητρικό τους [113, 114]. Η χρήση του στελέχους *OverExpress C41 (DE3)* προτιμάται έναντι του *OverExpress C43 (DE3)* καθώς το τελευταίο διαθέτει μια σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο *lacI* της περιοχής *DE3* - που δεν την διαθέτουν τα άλλα δύο στελέχη- και το καθιστά λιγότερο ευαίσθητο στον επαγωγέα *IPTG* εμφανίζοντας μεγαλύτερα ποσοστά καταστολής της έκφρασης των στοιχείων που υπόκεινται στον έλεγχο του οπερωνίου *lac*. Για αυτό τον λόγο προτιμάται η χρήση του στελέχους *OverExpress C41 (DE3)* όταν ο φορέας έκφρασης διαθέτει το δικό του αντίγραφο του γονιδίου *lacI* [112].

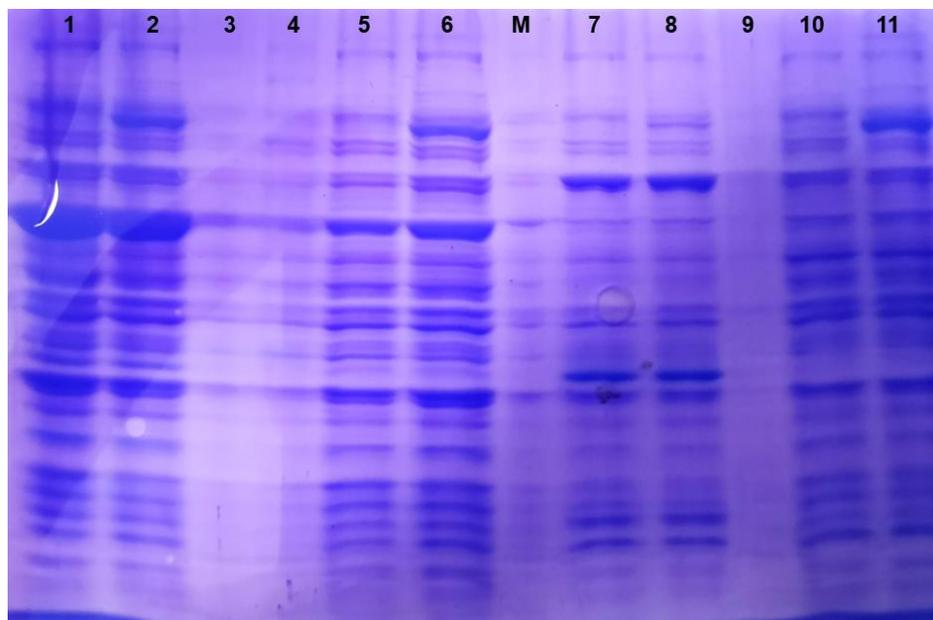
Δοκιμές έκφρασης *HbGP* στο στέλεχος *OverExpress C41 (DE3)*:

Όλα τα βήματα που οδηγούσαν στην έκφραση (μετασχηματισμός, υγρές καλλιέργειες, επαγωγή) αλλά και αυτά της επεξεργασίας των δειγμάτων έγιναν με τον ίδιο τρόπο που περιεγράφηκαν και στα παραπάνω εδάφια.

Τα αποτελέσματα των πηκτών *SDS*- πολυακρυλαμίδης (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.



Εικόνα 4.1.στ: Ανάλυση πηκτής SDS- πολυακρυλαμίδης (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες του διαλυτού μέρους (*Soluble*). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους βρίσκεται στην διαδρομή που έχει σημανθεί ως *M*. Κάθε διαδρομή έχει αριθμηθεί κατά αύξοντα αριθμό και αντιστοιχεί σε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδοί. 1: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (- *IPTG*), 2: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (+ *IPTG*), 4: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (- *IPTG*), 5: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (+ *IPTG*), 7: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (- *IPTG*), 8: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (+ *IPTG*), 10: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (- *IPTG*), 11: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (+ *IPTG*).Μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην *HbGP*: 98,8 *kDa*.



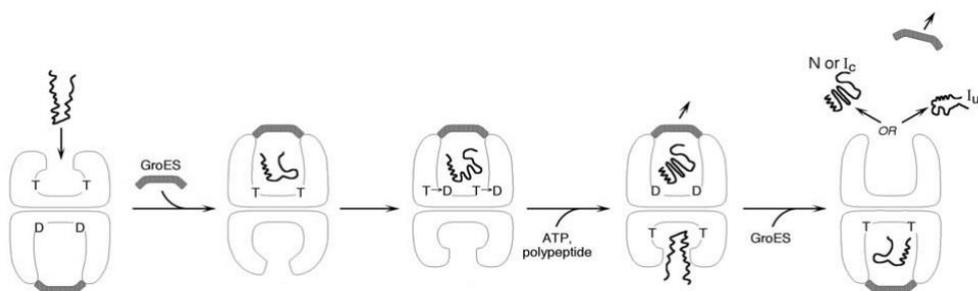
Εικόνα 4.1.ε: Ανάλυση πηκτής SDS- πολυακρυλαμίδης (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες του αδιάλυτου μέρους (*Total*). Ο μάρτυρας μοριακού βάρους βρίσκεται στην διαδρομή που έχει σημανθεί ως *M*. Κάθε διαδρομή έχει αριθμηθεί κατά αύξοντα αριθμό και αντιστοιχεί σε βακτηριακά κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί με τα πλασμίδια που κωδικοποιούν τις μοριακές συνοδοί. 1: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (- *IPTG*), 2: Πλασμίδιο *pG-KJE8* (1) (+ *IPTG*), 4: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (- *IPTG*), 5: Πλασμίδιο *pGro7* (2) (+ *IPTG*), 7: Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (- *IPTG*), 8:

Πλασμίδιο *pKJE7* (3) (+ *IPTG*), 10: Πλασμίδιο *pTf16* (5) (- *IPTG*), 11: Πλασμίδιο *pTf 16* (5) (+ *IPTG*). Μοριακό βάρος που αντιστοιχεί στην *HbGP*: 98,8 *KDa*.

Τελικά επιτεύχθηκε η υπερέκφραση της *HbGP* και ο εντοπισμός της στο διαλυτό μέρος με την βοήθεια των μοριακών συνοδών που εκφράζονται από το πλασμίδιο *pGro7*. Το πλασμίδιο *pGro7* κωδικοποιεί τις μοριακές συνοδούς *GroEL-GroES*. Η *GroEL* είναι ένα δεκατετραμερές, με κάθε υπομονάδα της να έχει μοριακό βάρος 57 *KDa*. Οι υπομονάδες της σχηματίζουν δύο δακτυλίους που στοιβάζονται ο ένας πάνω στον άλλον σχηματίζοντας μία κεντρική κοιλότητα. Κάθε υπομονάδα αποτελείται από τρεις επικράτειες: την ισημερινή (μέσω της οποίας γίνεται η σύνδεση της *ATP* και της *ADP*), την ακραία (μέσω της οποίας πραγματοποιείται η σύνδεσή της με τα προς αναδίπλωση πεπτιδία και η αλληλεπίδραση με την *GroES*) και τη διάμεση μέσω της οποίας συνδέονται η ισημερινή με την ακραία επικράτεια. Η διάμεση επικράτεια χαρακτηρίζεται από την παρουσία στα άκρα της εύκαμπτων συνδέσμων που επιτρέπουν την κίνηση των υπομονάδων κατά την διάρκεια αναδίπλωσης του πεπτιδίου. Η *GroES* από την άλλη πλευρά είναι ένα επταμερές, με κάθε υπομονάδα της να έχει μοριακό βάρος 10 *KDa*. Η *GroES* έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με την *GroEL* παρουσία *ATP/ADP* καλύπτοντας την μία πλευρά της *GroEL* σχηματίζοντας ένα ασύμμετρο σύμπλοκο [115].

Ο κύκλος αναδίπλωσης ξεκινά με την αλληλεπίδραση των υδρόφοβων πλευρικών αλυσίδων ενός αποδιατεταγμένου πεπτιδίου με την ακραία επικράτεια στον ανοικτό δακτύλιο της *GroEL*. Η σύνδεση της *GroES* και της *ATP* στην ίδια επικράτεια έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη ταλαντώσεων οι οποίες θα μετατοπίσουν το πεπτίδιο από την υδρόφοβη επιφάνεια στο εσωτερικό μιας απομονωμένης κοιλότητας όπου και θα λάβει χώρα η αναδίπλωση του πεπτιδίου. Η διαδικασία τερματίζεται με την υδρόλυση της *ATP* και τη σύνδεση μιας *GroES*, *ATP* και ενός άλλου αποδιατεταγμένου πεπτιδίου στο δεύτερο δακτύλιο της *GroEL*. Το πεπτίδιο που απελευθερώνεται τελικά είτε μπορεί να έχει λάβει την τελική του διαμόρφωση, είτε να βρίσκεται σε μία “μερικώς” αναδιπλωμένη κατάσταση, είτε να εντοπίζεται εκ νέου σε αποδιατεταγμένη διαμόρφωση. Ανεξάρτητα από το αποτέλεσμα το πεπτίδιο μπορεί εκ νέου να συνδεθεί στις μοριακές συνοδούς για να ξεκινήσει έναν νέο κύκλο αναδίπλωσης.

Η επιτυχημένη αναδίπλωση των πεπτιδίων με τη μεσολάβηση των συγκεκριμένων μοριακών συνοδών οφείλεται: α. Στο γεγονός ότι στην εσωτερική κοιλότητα της *GroEL* συνδέεται μόνο ένα πεπτίδιο, γεγονός που αποτρέπει το σχηματισμό συσσωματωμάτων σε περίπτωση που αυτό ερχόταν σε επαφή με άλλα μη-σωστά αναδιπλωμένα πεπτίδια, β. στο γεγονός ότι η εσωτερική κοιλότητα στην οποία λαμβάνει χώρα η αναδίπλωση του πεπτιδίου έχει υδρόφιλο χαρακτήρα, πράγμα που σημαίνει ότι προωθείται η εσωτερίκευση των υδρόφοβων περιοχών του πεπτιδίου στο εσωτερικό του, γ. στη διάμετρο της κοιλότητας που πραγματοποιείται η αναδίπλωση, καθώς στα 60 Å επιτρέπονται περιορισμένες κινήσεις ατόμων [115].



Εικόνα 4.1.ζ: Σχηματική απεικόνιση ενός κύκλου αναδίπλωσης ενός αποδιατεταγμένου πεπτιδίου από τις μοριακές συνοδούς *GroEL-GroES* (επεξεργασμένη από [115]).

4.2 Απομόνωση *HbGP*

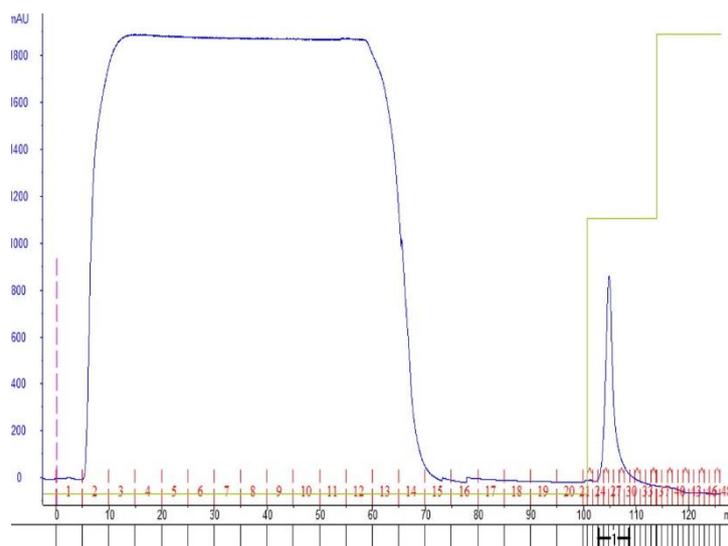
Το γονίδιο που κωδικοποιεί την *HbGP* υπερεκφράστηκε σε βακτήρια του στελέχους *E. coli OverExpress C41 (DE3)*, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω. Η καθαρή πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση κινητικών μελετών.

1^ο Βήμα καθαρισμού: *HiTrap TALON crude* (ακίνητοποιημένα ιόντα Co^{2+} σε σφαιρίδια σεφαρόζης)

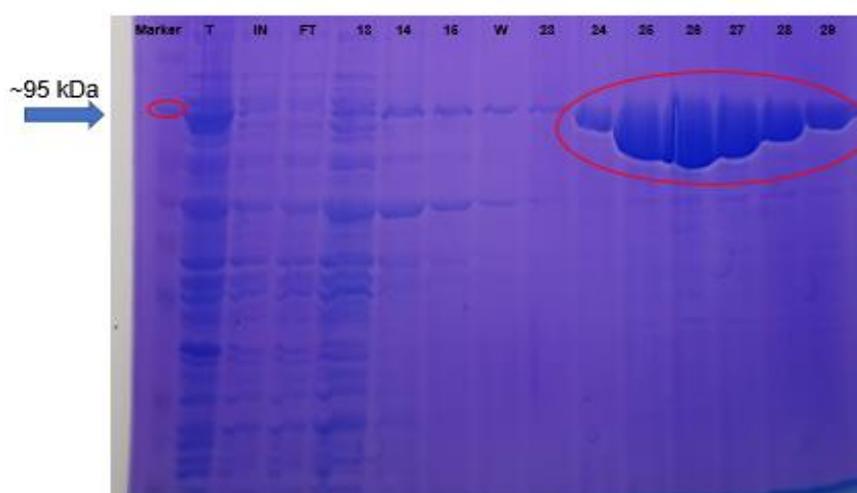
Η *HbGP* λόγω της συγγένειας που παρουσιάζει η ετικέτα των 6 ιστιδινών (6x *His Tag*) προσδένεται στα ιόντα Co^{2+} που είναι ακίνητοποιημένα στη στήλη. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο περιείχαν ιμιδαζόλιο σε χαμηλή συγκέντρωση (10 mM) το οποίο παρουσιάζει και αυτό συγγένεια με τα ιόντα Co^{2+} . Η παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ιμιδαζολίου στα διαλύματα εξισορρόπησης και έκπλυσης διευκολύνουν τη σύνδεση της *HbGP*, καθώς αυτό εμποδίζει τη μη-ειδική σύνδεση

άλλων πρωτεϊνών. Αντιθέτως το διάλυμα έκλυσης διαθέτει μιδαζόλιο σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (500 mM), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αποσύνδεση της πρωτεΐνης από τη στήλη. Το μιδαζόλιο ανταγωνίζεται τα 6 κατάλοιπα ιστιδίνης της ετικέτας αχιστείας, οδηγώντας στην έκλυση της *HbGP*.

Παρακάτω απεικονίζονται το χρωματογράφημα και η ανάλυση των κλασμάτων της απομόνωσης σε πηκτή *SDS*-πολυακρυλαμίδης (10%).



Εικόνα 4.2.α: 1^ο βήμα καθαρισμού της *HbGP*. Τα κλάσματα 2-14 αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες που δεν είχαν συγγένεια με το υλικό της στήλης και επομένως δεν συνδέθηκαν (*flow-through*). Στα κλάσματα 15-22 περιέχονται πρωτεΐνες που απομακρύνθηκαν από την έκπλυση της στήλης (*wash*). Τα κλάσματα 23-29 συλλέχθηκαν κατά την έκλυση (*elution*) και περιέχουν την *HbGP*.

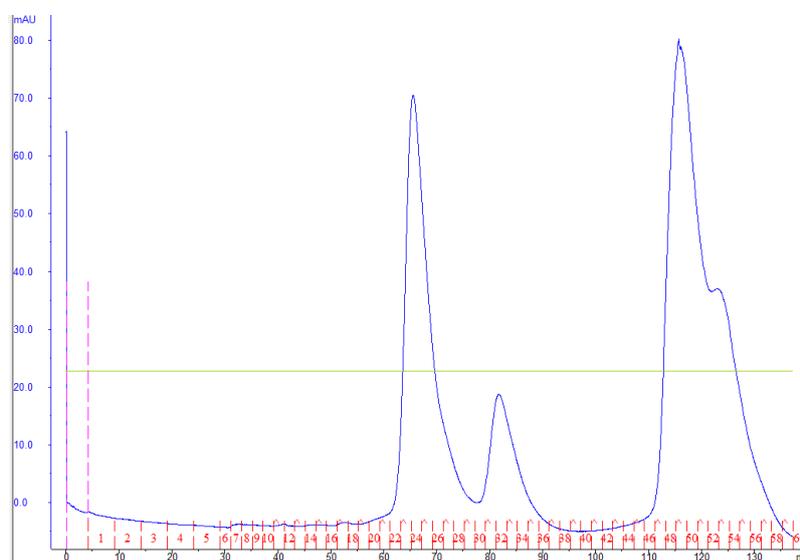


Εικόνα 4.2.β: Πηκτή *SDS*-πολυακρυλαμίδης του 1^{ου} βήματος καθαρισμού της *HbGP*. Τα κλάσματα 2-14 αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες που δεν είχαν συγγένεια με το υλικό της στήλης και επομένως δεν συνδέθηκαν

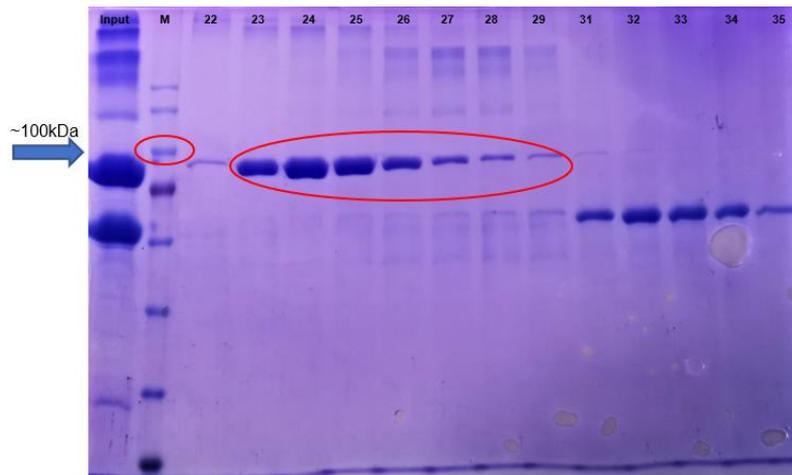
(*flow-through*). Στα κλάσματα 15-22 περιέχονται πρωτεΐνες που απομακρύνθηκαν από την έκπλυση της στήλης (*wash*). Τα κλάσματα 23-29 συλλέχθηκαν κατά την έκλουση (*elution*) και περιέχουν την *HbGP*.

Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά την έκλουση (23-29) ενώθηκαν με αποτέλεσμα να προκύψει πρωτεϊνικό διάλυμα όγκου 7 mL. Το πρωτεϊνικό διάλυμα χωρίστηκε σε 2 ίσα μέρη (3,5 mL) και συμπυκνώθηκε με φίλτρο που έχει ως κατώφλι τα 30 KDa. Μετά την συμπύκνωση προέκυψε διάλυμα *HbGP* τελικού όγκου 280 μL και συγκέντρωσης 1,3 mg/ mL, το οποίο αποθηκεύεται σε 50% γλυκερόλη στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

2^ο Βήμα καθαρισμού: Superdex S200



Εικόνα 4.2.γ: 2^ο βήμα καθαρισμού της *HbGP*. Η *HbGP* εντοπίζεται στα κλάσματα 23-29.



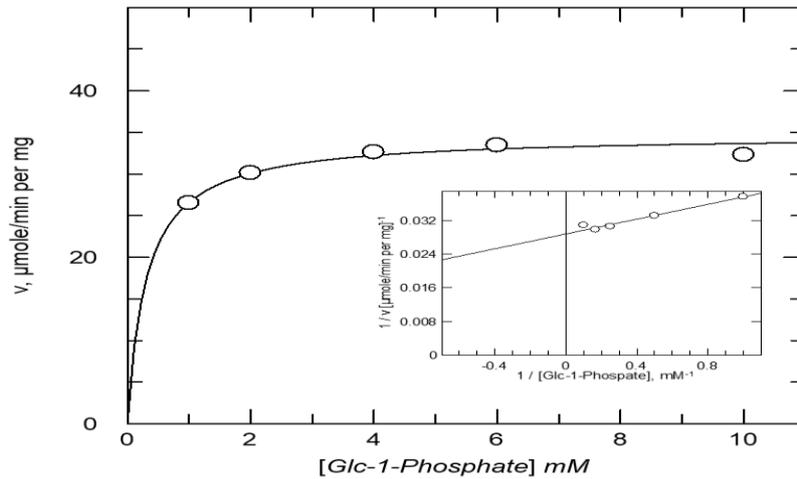
Εικόνα 4.2.δ: Πηκτή *SDS*- πολυακρυλαμίδης του 2^{ου} βήματος καθαρισμού της *HbGP*. Τα κλάσματα 22-29 αντιπροσωπεύουν την *HbGP*. Τα κλάσματα 31-35 αντιπροσωπεύουν την *BSA* που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση φωσφορυλίωσης της *HbGP*.

Τα κλάσματα 23-27 ενώθηκαν με αποτέλεσμα να προκύψει πρωτεϊνικό διάλυμα όγκου 10 mL. Το πρωτεϊνικό διάλυμα υφίσταται συμπύκνωση με φίλτρο που έχει ως κατώφλι τα 30 *KDa*. Μετά την συμπύκνωση προκύπτει διάλυμα *HbGP* τελικού όγκου 300 μ L και συγκέντρωσης 1,44 *mg/mL*, το οποίο αποθηκεύεται σε 50% γλυκερόλη στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

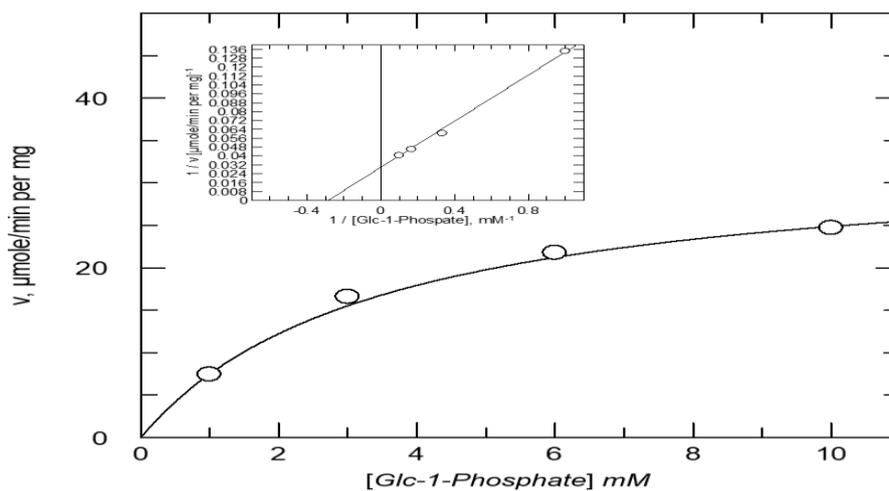
4.3 Κινητικές μελέτες

4.3.1 Κινητική μελέτη φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGPa-HbGPb*)

Οι κινητικές παράμετροι (K_m , V_{max}) της *HbGPa* προσδιορίστηκαν παρουσία και απουσία της *AMP*. Παρουσία *AMP* (σε σταθερή συγκέντρωση 1 *mM*) η $K_m = 0,31 \pm 0,028$ *mM* και η $V_{max} = 34,69 \pm 0,51$ μ mol/min/mg. Απουσία *AMP* η $K_m = 3,48 \pm 0,15$ *mM* και η $V_{max} = 33,53 \pm 0,69$ μ mol/min/mg. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες ειδικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με την συγκέντρωση του υποστρώματος (*G1P*).

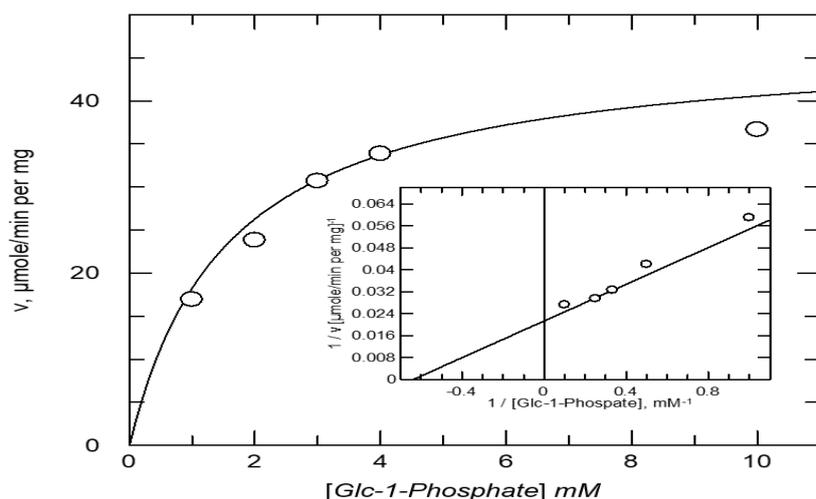


Εικόνα 4.3.1.α: Διάγραμμα *Michaelis-Menten* κινητικής μελέτης της *HbGPα* παρουσία *AMP* (1 mM) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος *Glc-1-Phosphate* (1,2,3,4,6,10 mM), στη κατεύθυνση σύνθεσης γλυκογόνου, με σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0,2% w/v). Εσωτερικά του διαγράμματος, στη κενή περιοχή βρίσκεται το διάγραμμα *Lineweaver- Burk* από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m , V_{max} .



Εικόνα 4.3.1.β: Διάγραμμα *Michaelis-Menten* κινητικής μελέτης της *HbGPα* απουσία *AMP* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος *Glc-1-Phosphate* (1,2,3,4,6,10 mM), στην κατεύθυνση σύνθεσης γλυκογόνου, με σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0,2% w/v). Εσωτερικά του διαγράμματος, στην κενή περιοχή βρίσκεται το διάγραμμα *Lineweaver- Burk* από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m , V_{max} .

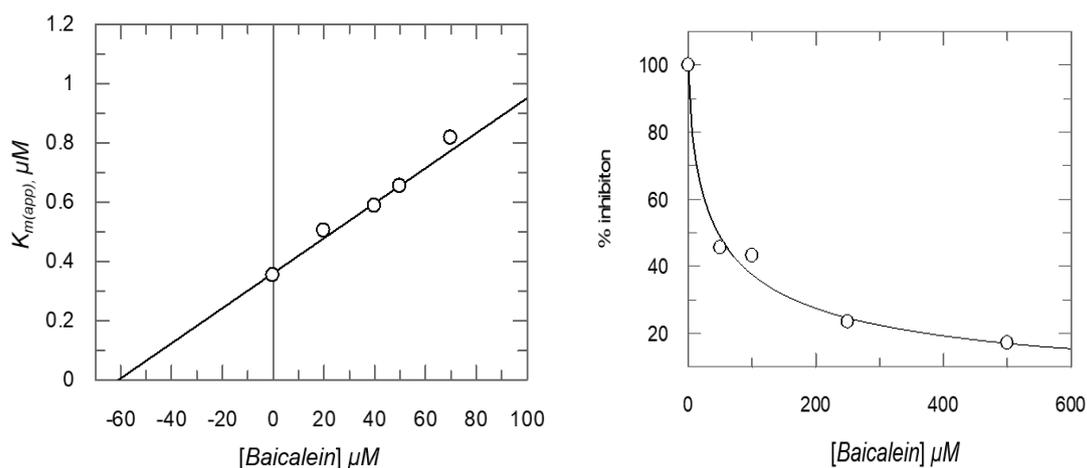
Οι κινητικές παράμετροι (K_m , V_{max}) της *HbGPβ* προσδιορίστηκαν παρουσία της *AMP* σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Η $K_m = 1,57 \pm 0,44$ mM και η $V_{max} = 46,92 \pm 3,79$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζονται οι καμπύλες ειδικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος (*G1P*).



Εικόνα 4.3.1.γ: Διάγραμμα *Michaelis-Menten* κινητικής μελέτης της *HbGPb* απουσία *AMP* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος *Glc-1-Phosphate* (1,2,3,4,6,10 *mM*), στην κατεύθυνση σύνθεσης γλυκογόνου, με σταθερή συγκέντρωση γλυκογόνου (0,2% w/v). Εσωτερικά του διαγράμματος, στην κενή περιοχή βρίσκεται το διάγραμμα *Lineweaver-Burk* από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m , V_{max} .

4.3.2 Προσδιορισμός K_i και IC_{50} του αναστολέα βαϊκαλεΐνη έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGPa*)

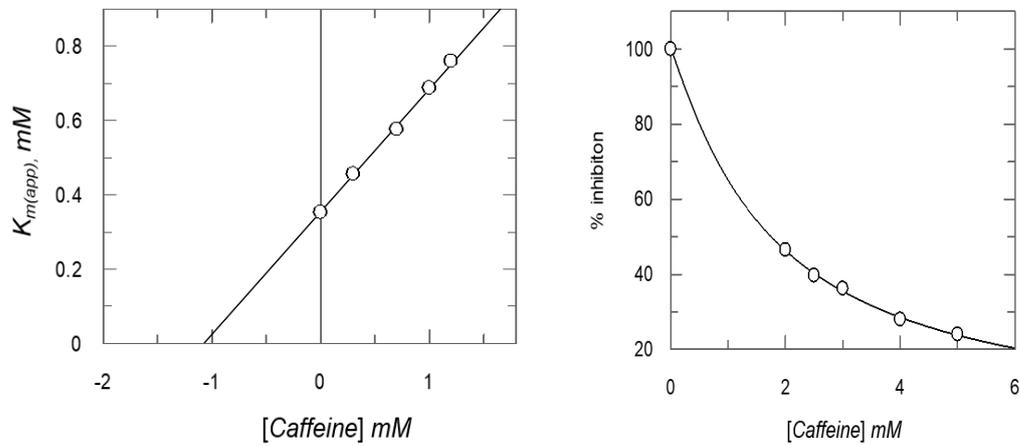
Η σταθερά αναστολής K_i , καθώς και η τιμή IC_{50} του αναστολέα βαϊκαλεΐνη έναντι της *HbGPa* προσδιορίστηκαν παρουσία της *AMP* σε σταθερή συγκέντρωση (1 *mM*). Η $K_i = 61,05 \pm 3,91 \mu\text{M}$ και η $IC_{50} = 46,54 \pm 9,64 \mu\text{M}$.



Εικόνα 4.3.2.α: Αναστολή της *HbGPa* από την βαϊκαλεΐνη.

4.3.3 Προσδιορισμός K_i και IC_{50} του αναστολέα καφεΐνη έναντι της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGPa*)

Η σταθερά αναστολής K_i , καθώς και η τιμή IC_{50} του αναστολέα καφεΐνη έναντι της $HbGPa$ προσδιορίστηκαν παρουσία της AMP σε σταθερή συγκέντρωση (1 mM). Η $K_i = 1,075 \pm 0,03\text{ mM}$ και η $IC_{50} = 1,75 \pm 0,04\text{ mM}$.



Εικόνα 4.3.2.β: Αναστολή της $HbGPa$ από την καφεΐνη.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε βιοχημικός χαρακτηρισμός της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου από ανθρώπινο εγκέφαλο (*HbGP*). Το γονίδιο που τη κωδικοποιεί (*PYGB*) βρίσκεται εντεθειμένο σε πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης *pet-28a*. Η προς έκφρασης πρωτεΐνη έχει μοριακό βάρος 98,8 *KDa*, θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (*pI*): 6.60 και ετικέτα αγκιστείας έξι ιστιδινών (*His-Tag*) στο *N*-τελικό της άκρο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δοκιμές έκφρασης της πρωτεΐνης με ταυτόχρονη παρουσία μοριακών συνοδών οι οποίες βοηθούν τη πρωτεΐνη να λάβει τη τελική της λειτουργική διαμόρφωση. Οι δοκιμές έκφρασης είχαν ως στόχο την εύρεση του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους στο οποίο πραγματοποιείται έκφραση της πρωτεΐνης στο διαλυτό κλάσμα αλλά και του συνδυασμού των μοριακών συνοδών που υποβοηθούν αυτή τη διαδικασία. Τελικά ο βέλτιστος συνδυασμός κυτταρικού στελέχους και μοριακών συνοδών ο οποίος έδειξε ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης ήταν: *E. coli OverExpress C41 (DE3)*, *pGro7*. Οι συνθήκες υπερέκφρασης που επιλέχθηκαν ήταν: συγκέντρωση επαγωγέα *IPTG*: 0,5 *mM*, θερμοκρασίας: 16 °C, χρόνου επαγωγής: 16 ώρες. Έπειτα πραγματοποιήθηκε επιτυχώς υπερέκφραση της *HbGP* σε μεγάλη κλίμακα και καθαρισμός της σε σύστημα ταχείας υγρής χρωματογραφίας πρωτεϊνών *ÄKTA-FPLC* με τη χρήση δύο χρωματογραφικών στηλών (στήλη συγγένειας, στήλη μοριακής διήθησης). Η προαναφερθείσα διαδικασία είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση της *HbGPa* σε συγκέντρωση: 1,44 *mg/mL* και της *HbGPb* σε συγκέντρωση: 1,30 *mg/mL*, οι οποίες τελικώς χρησιμοποιήθηκαν σε κινητικές μελέτες για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων (K_m , V_{max}). Οι τιμές K_m , V_{max} αντίστοιχα για την *HbGPa* προσδιορίστηκαν παρουσία και απουσία *AMP*. Παρουσία *AMP* η K_m προσδιορίστηκε: $0,31 \pm 0,02$ *mM* και η V_{max} = $34,68 \pm 0,51$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Απουσία *AMP* η K_m προσδιορίστηκε: $3,48 \pm 0,14$ *mM* και η V_{max} = $33,52 \pm 0,69$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Ταυτόχρονα προσδιορίστηκαν οι τιμές K_m , V_{max} και για την *HbGPb* παρουσία *AMP*. Η K_m προσδιορίστηκε: $1,56 \pm 0,43$ *mM* και η V_{max} = $46,92 \pm 3,78$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Τελικά πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με γνωστούς αναστολείς της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου (βαϊκαλεΐνη, καφεΐνη) για τον προσδιορισμό της σταθεράς αναστολής K_i και της τιμής IC_{50} έναντι της *HbGPa* παρουσία *AMP*. Έτσι προέκυψε πως η K_i της βαϊκαλεΐνης ισούται με 61,05

$\pm 3,90 \mu M$ και η $IC_{50} = 46,54 \pm 9,63 \mu M$. Η K_i της καφεΐνης ισούται $1,07 \pm 0,02 mM$ και η $IC_{50} = 1,75 \pm 0,04 mM$.

Μελλοντικά κρίνεται αναγκαία η τροποποίηση του πρωτοκόλλου καθαρισμού της *HbGP* με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί η απομόνωσή της στις ίδιες ή και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις χωρίς την ετικέτα αγκιστείας έξι ιστιδινών (*His-Tag*) στο *N*-τελικό της άκρο. Επιπλέον θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν κινητικές μελέτες παρουσία ενεργοποιητών της *HbGP*. Οι κινητικές μελέτες της *HbGP* παρουσία ικανών ενεργοποιητών θα μπορούσε να δώσει την δυνατότητα εύρεσης πιθανών φαρμακευτικών μορίων, τα οποία θα συνέβαλαν στην αντιμετώπιση των νευροεκφυλιστικών ασθενειών που προκαλούνται από την υπέρμετρη συσσώρευση πολυσακχαριτών στα νευρικά κύτταρα του εγκεφάλου των ασθενών [90].

6. Βιβλιογραφία

1. Preiss, J.W.D., *The comparative biochemistry of glycogen and starch*. John Wiley and Sons, 1981: p. 199-314.
2. Ball, S., et al., *From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule*. Cell, 1996. **86**(3): p. 349-52.
3. Zeeman, S.C., S.M. Smith, and A.M. Smith, *The diurnal metabolism of leaf starch*. Biochem J, 2007. **401**(1): p. 13-28.
4. Roach, P.J., et al., *Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes*. Biochem J, 2012. **441**(3): p. 763-87.
5. Gunja-Smith Z, M.J., Mercier C, Smith EE, Whelan WJ., *Whelan WJ. A revision of the Meyer–Bernfeld model of glycogen and amylopectin*. FEBS Lett., 1970. **12**: p. 101-104.
6. Jeremy M. Berg, J.L.T., Lubert Stryer, *Βιοχημεία*. 2014: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
7. Shearer J, G.T., *Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise*. Exercise Sport Sci Rev., 2004. **32**: p. 120-126.
8. Melendez-Hevia, E., T.G. Waddell, and E.D. Shelton, *Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule*. Biochem J, 1993. **295 (Pt 2)**: p. 477-83.
9. Meléndez R, M.-H.E., Cascante M. , *How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building*. J Mol Evol., 1997. **45**: p. 446-455.
10. Goldsmith E, S.S., Fletterick R, *Structure of maltoheptaose by difference Fourier methods and a model for glycogen*. J Mol Biol, 1982. **156**: p. 411-427.
11. Kirkman BR, W.W., Bailey JM, *The distribution of glucosamine in mammalian glycogen from different species, organs and tissues*. Biofactors, 1989. **2**: p. 123-126.
12. Kirkman BR, W.W., *Glucosamine is a normal component of liver glycogen*. FEBS Lett, 1986. **194**: p. 6-11.
13. JD, F., *The presence of phosphate in glycogen* FEBS Lett, 1980. **109**: p. 85-92.

14. Tagliabracci VS, H.C., Karthik C, Contreras CJ, Glushka J, Ishihara M, Azadi P, Hurley TD, DePaoli-Roach AA, Roach PJ, *Phosphate incorporation during glycogen synthesis and Lafora disease*. Cell Metab., 2011. **13**.
15. McGarry JD, K.M., Newgard CB, Foster DW, Katz J, *From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round*. Annu Rev Nutr, 1987. **7**: p. 51-73.
16. Thorens B, M.M., *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010. **298**: p. E141-E145.
17. Roach, P.S., AV.; Harris, RA., *Regulation of glycogen metabolism*. Handbook of Physiology Section 7: The Endocrine System volume II, ed. L.C. Jefferson, AD. 2001, Oxford: Oxford University Press. 609-647.
18. Yagi T, B.-F.E., Yamamoto R, Muñoz FJ, Akazawa T, Hong KS, Pozueta-Romero J., *Cloning, expression and characterization of a mammalian Nudix hydrolase-like enzyme that cleaves the pyrophosphate bond of UDP-glucose*. Biochem J, 2003. **370**: p. 409-415.
19. Roach PJ, S.A., *Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1997. **57**: p. 289-316.
20. Alonso MD, L.J., Lomako WM, Whelan WJ, *A new look at the biogenesis of glycogen*. FASEB J, 1995. **9**: p. 1126-1137.
21. Lomako J, L.W., Whelan WJ., *Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1673**(43-55).
22. Smythe C, C.P., *The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis*. Eur J Biochem, 1991. **200**: p. 625–631.
23. Duran, J. and J.J. Guinovart, *Brain glycogen in health and disease*. Mol Aspects Med, 2015. **46**: p. 70-7.
24. Brown, A.M., *Brain glycogen re-awakened*. J Neurochem, 2004. **89**(3): p. 537-52.
25. Zois CE, H.A., *Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy*. Journal of Molecular Medicine-Jmm, 2016. **94**(2): p. 137-154.
26. Muller, M.S., et al., *Isoform-selective regulation of glycogen phosphorylase by energy deprivation and phosphorylation in astrocytes*. Glia, 2015. **63**(1): p. 154-62.

27. Agius, L., *Role of glycogen phosphorylase in liver glycogen metabolism*. Mol Aspects Med, 2015. **46**: p. 34-45.
28. Youngren, J.F., *Regulation of insulin receptor function*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(7-8): p. 873-91.
29. Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux, *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*. J Mol Biol, 1965. **12**: p. 88-118.
30. Newgard, C.B., P.K. Hwang, and R.J. Fletterick, *The family of glycogen phosphorylases: structure and function*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1989. **24**(1): p. 69-99.
31. Mathieu C, L.d.I.S.-G.I., Duval R, Xu X, Cocaign A, L eger T, Woffendin G, Camadro J-M, Etchebest C, Haouz A et al, *Insights into brain glycogen metabolism: the structure of human brain glycogen phosphorylase*. Biol Chem J, 2016. **291**: p. 18072–18083.
32. Cohen, P., *The subunit structure of rabbit-skeletal-muscle phosphorylase kinase, and the molecular basis of its activation reactions*. Eur J Biochem, 1973. **34**(1): p. 1-14.
33. Cohen, P., *Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1983. **302**(1108): p. 13-25.
34. Cohen, P., *Phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle*. Methods in enzymology, 1983. **99**: p. 243-250.
35. Fletterick, R.J. and N.B. Madsen, *The structures and related functions of phosphorylase a*. Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 31-61.
36. Dombradi, V., *Structural aspects of the catalytic and regulatory function of glycogen phosphorylase*. Int J Biochem, 1981. **13**(2): p. 125-39.
37. Lowry O. H., S.D., Passonneau J. V., *The kinetics of glycogen phosphorylase from brain and muscle*. J. Biol. Chem, 1967: p. 242-271.
38. Guenard, D., M. Morange, and H. Buc, *Comparative study of the effect of 5' AMP and its analogs on rabbit glycogen phosphorylase b isoenzymes*. Eur J Biochem, 1977. **76**(2): p. 447-52.
39. Johnson, L.N., S.H. Hu, and D. Barford, *Catalytic mechanism of glycogen phosphorylase*. Faraday Discuss, 1992(93): p. 131-42.

40. Fletterick RJ, S.S., *Glycogen-Phosphorylase Structures and Function*. Accounts of Chemical Research, 1982. **15**: p. 361-369.
41. Sprang, S.R., et al., *Structural basis for the activation of glycogen phosphorylase b by adenosine monophosphate*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1367-71.
42. Martin, J.L., L.N. Johnson, and S.G. Withers, *Comparison of the binding of glucose and glucose 1-phosphate derivatives to T-state glycogen phosphorylase b*. Biochemistry, 1990. **29**(48): p. 10745-57.
43. Johnson, L.N., et al., *Refined crystal structure of the phosphorylase-heptulose 2-phosphate-oligosaccharide-AMP complex*. J Mol Biol, 1990. **211**(3): p. 645-61.
44. Tsitsanou, K.E., V.T. Skamnaki, and N.G. Oikonomakos, *Structural basis of the synergistic inhibition of glycogen phosphorylase a by caffeine and a potential antidiabetic drug*. Arch Biochem Biophys, 2000. **384**(2): p. 245-54.
45. Oikonomakos, N.G., et al., *The 1.76 Å resolution crystal structure of glycogen phosphorylase B complexed with glucose, and CP320626, a potential antidiabetic drug*. Bioorg Med Chem, 2002. **10**(5): p. 1313-9.
46. Kantsadi, A.L., et al., *Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of Vitis vinifera extracts against glycogen phosphorylase*. Food Chem Toxicol, 2014. **67**: p. 35-43.
47. Leonidas, D.D., et al., *Phytogenic Polyphenols as Glycogen Phosphorylase Inhibitors: The Potential of Triterpenes and Flavonoids for Glycaemic Control in Type 2 Diabetes*. Curr Med Chem, 2017. **24**(4): p. 384-403.
48. A.L., G.K.N.S., *Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2013. **23**: p. 1017–1032.
49. S., D.-M.M.V., *Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review*. Expert Opin Ther Pat, 2016. **26**: p. 199-212.
50. AL, Z.C.H., *Glycogen metabolism has a key role in the cancer microenvironment and provides new targets for cancer therapy*. J Mol Med (Berl), 2016. **94**: p. 137-154.
51. Weinstein, J.W.D., *Glycogen storage diseases*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**: p. 95-102.

52. J. Duran, A.G., M. Garcia-Rocha, J.M. Garcia-Delgado, J.J. Guinovart, *Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease*. Hum Mol Genet, 2014. **23**: p. 3147-3156.
53. J-F Cloix, T.H., *Glycogen as a putative target for diagnosis and therapy in brain pathologies*. ISRN Pathol, 2011. **2011**: p. 1-17.
54. Johnson, L.N., *Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors*. Faseb J, 1992. **6**(6): p. 2274-2282.
55. J.M. Hayes , A.L.K., D.D. Leonidas, *Natural products and their derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase: potential treatment for type 2 diabetes*. Phytochemistry Reviews, 2014. **13**(471-498).
56. Kantsadi, A.L., et al., *Synthetic, enzyme kinetic, and protein crystallographic studies of C-beta-d-glucopyranosyl pyrroles and imidazoles reveal and explain low nanomolar inhibition of human liver glycogen phosphorylase*. Eur J Med Chem, 2016. **123**: p. 737-745.
57. Papageorgiou, A.C., N.G. Oikonomakos, and D.D. Leonidas, *Inhibition of rabbit muscle glycogen phosphorylase by D-gluconohydroximo-1,5-lactone-N-phenylurethane*. Arch Biochem Biophys, 1989. **272**(2): p. 376-85.
58. Anand David, A.V., R. Arulmoli, and S. Parasuraman, *Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid*. Pharmacogn Rev, 2016. **10**(20): p. 84-89.
59. *Chemical Structure of Quercetin*. 2004: PubChem.
60. Gregoriou, M., et al., *The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: the role of the water structure and its contribution to binding*. Protein Sci, 1998. **7**(4): p. 915-27.
61. Pinotsis, N., et al., *The binding of beta- and gamma-cyclodextrins to glycogen phosphorylase b: kinetic and crystallographic studies*. Protein Sci, 2003. **12**(9): p. 1914-24.
62. Oikonomakos, N.G., *Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy*. Curr Protein Pept Sci, 2002. **3**(6): p. 561-86.
63. Oikonomakos, N.G., et al., *A new allosteric site in glycogen phosphorylase b as a target for drug interactions*. Structure, 2000. **8**(6): p. 575-84.

64. Barford, D. and L.N. Johnson, *The allosteric transition of glycogen phosphorylase*. Nature, 1989. **340**(6235): p. 609-16.
65. Rath, V.L., et al., *Activation of human liver glycogen phosphorylase by alteration of the secondary structure and packing of the catalytic core*. Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 139-148.
66. Barford, D. and L.N. Johnson, *The molecular mechanism for the tetrameric association of glycogen phosphorylase promoted by protein phosphorylation*. Protein Sci, 1992. **1**(4): p. 472-93.
67. Brown, A.M. and B.R. Ransom, *Astrocyte glycogen and brain energy metabolism*. Glia, 2007. **55**(12): p. 1263-71.
68. W. Bloom, D.W.F., *A textbook of histology*. 1968.
69. P.J. Magistretti, O.S., J.L. Martin, *Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: Physiological, pharmacological, and pathological aspects*. Astrocytes: pharmacology and function. 1993: San Diego, Academic Press.
70. Falkowska, A., et al., *Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 25959-81.
71. Hertz, L., L. Peng, and G.A. Dienel, *Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(2): p. 219-49.
72. Magistretti, P.J., et al., *Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells*. Dev Neurosci, 1993. **15**(3-5): p. 306-12.
73. A. Suzuki, S.A.S., O. Bozdagi, G. W. Huntley, R. H. Walker, P. J. Magistretti, C. M. Alberini, *Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation*. Cell, 2011. **144**: p. 810-823.
74. Cavanagh, J.B., *Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases*. Brain Res Brain Res Rev, 1999. **29**(2-3): p. 265-95.
75. Rohn, T.T., *Corpora Amylacea in Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect?* Int J Neurol Neurother, 2015. **2**(3).

76. Delgado-Escueta, A.V., S. Ganesh, and K. Yamakawa, *Advances in the genetics of progressive myoclonus epilepsy*. Am J Med Genet, 2001. **106**(2): p. 129-38.
77. Girard, J.M., et al., *Progressive myoclonus epilepsy*. Handb Clin Neurol, 2013. **113**: p. 1731-6.
78. G. R. Lafora, B.G., *B. Beitrag zur Histopathologie der myoklonischen Epilepsie*. Neurol. Psychiatr, 1911. **6**: p. 1-14.
79. Shahwan, A., M. Farrell, and N. Delanty, *Progressive myoclonic epilepsies: a review of genetic and therapeutic aspects*. Lancet Neurol, 2005. **4**(4): p. 239-48.
80. Madhavan, D. and R.I. Kuzniecky, *Lafora disease*. Rev Neurol Dis, 2006. **3**(3): p. 131-5.
81. Nitschke, F., et al., *Lafora disease - from pathogenesis to treatment strategies*. Nat Rev Neurol, 2018. **14**(10): p. 606-617.
82. Obel, L.F., et al., *Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level*. Front Neuroenergetics, 2012. **4**: p. 3.
83. S. Mitra, E.G., B.A. Minassian, *Lafora disease: Current biology and therapeutic approaches*. Neurobiol, 2021.
84. Bondi, M.W., E.C. Edmonds, and D.P. Salmon, *Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future*. J Int Neuropsychol Soc, 2017. **23**(9-10): p. 818-831.
85. Association, A.s., *2018 Alzheimer's disease facts and figures*. 2018. p. 367-429.
86. F. Liyuan, M.C., H. Zinchao, Z. Shuo, Y. Zhihua, H. Zhengwei, S. Huifang, F. Yu, D. Yali, Y. Jing, S. Changhe, X. Yuming, *New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease*. Front. Neurol., 2020. **10**: p. 1-12.
87. Tanzi, R.E., *The genetics of Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(10).
88. Kumar, A., et al., *Alzheimer Disease (Nursing)*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
89. D. Pirici, C.M., *Corpora Amylacea in Aging Brain and Age-Related Brain Disorders* Journal of Aging and Gerontology, 2014. **2**: p. 33-57.
90. Del Gaudio, F., et al., *Chemoproteomic fishing identifies arzanol as a positive modulator of brain glycogen phosphorylase*. Chem Commun (Camb), 2018. **54**(91): p. 12863-12866.

91. Appendino, G., et al., *Arzanol, an anti-inflammatory and anti-HIV-1 phloroglucinol alpha-Pyrone from Helichrysum italicum ssp. microphyllum*. J Nat Prod, 2007. **70**(4): p. 608-12.
92. Chen, I. and D. Dubnau, *DNA uptake during bacterial transformation*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(3): p. 241-9.
93. Panja, S., et al., *Role of membrane potential on artificial transformation of E. coli with plasmid DNA*. J Biotechnol, 2006. **127**(1): p. 14-20.
94. Divya Prakash, G., et al., *Bacterial transformation using micro-shock waves*. Anal Biochem, 2011. **419**(2): p. 292-301.
95. Chung, C.T., S.L. Niemela, and R.H. Miller, *One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2172-5.
96. Yoshida, N. and M. Sato, *Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **83**(5): p. 791-8.
97. B. M. Chassy, A.M., J. Flickinger, *Transformation of bacteria by electroporation* TIBTECH, 1988. **6**: p. 303-309.
98. D. Rajalingam, K.M.K., K. Ananthamurthy, P. D. Adams, T. K. Suresh-Kumar, *A method for the prevention of thrombin-induced degradation of recombinant proteins*. Anal Biochem, 2008. **2**: p. 361-363.
99. Gupta, P., et al., *Co-expression of chaperonin GroEL/GroES enhances in vivo folding of yeast mitochondrial aconitase and alters the growth characteristics of Escherichia coli*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(11): p. 1975-85.
100. Berisio, R., et al., *Protein titration in the crystal state*. J Mol Biol, 1999. **292**(4): p. 845-54.
101. Healthcare, G., *Ion Exchange Chromatography Principles and Methods*.
102. HealthCare, G., *Affinity Chromatography - Principles and Methods*. 2007.
103. Hage, D.S., *Handbook of Affinity Chromatography*. 2 ed. 2006: CRC Press.
104. Turkova, J., *Affinity chromatography of proteases of hydroxyalkyl methacrylate gels with covalently attached inhibitors*. J Chromatogr, 1978. **148**(1): p. 293-7.
105. Walters, R.R., *Affinity chromatography*. Anal Chem, 1985. **57**(11): p. 1099A-1101A, 1102A-1106A passim.

106. Reichetl, S., *Affinity Chromatography Methods in Molecular Biology*. 2015, New York: Springer.
107. Wilchek, M., *Affinity Chromatography* Makromol. Chemie, 1984. **123**: p. 175-183.
108. Rodriguez, E.L., et al., *Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2020. **1157**: p. 122332.
109. Burgess, R.R., *A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting*. Protein Expr Purif, 2018. **150**: p. 81-85.
110. Saheki, S., A. Takeda, and T. Shimazu, *Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity*. Anal Biochem, 1985. **148**(2): p. 277-281.
111. Staines, E.S.L., *GraFit* R.J. Leatherbarrow, Editor. 1998.
112. Chaille T. Webb, T.L., *Deciphering the transcriptional changes in Escherichia coli strains C41(DE3) and C43(DE3) that makes them a superior choice for membrane protein production*.
113. Schlegel S., G.P., de Gier JW., *De-convoluting the Genetic Adaptations of E. coli C41(DE3) in Real Time Reveals How Alleviating Protein Production Stress Improves Yields*. Cell Rep., 2015. **10**(10): p. 1758-1766.
114. Wagner, S., et al., *Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(38): p. 14371-6.
115. Horwich, W.A.F.A.L., *Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide*. Cambridge University Press, 2003. **36**(2): p. 229–256.

7. Παράτημα

Αμινοξική αλληλουχία *HbGP*

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAKPLTDSEKRKQISVRGLAGLDVAEVRKSFNRHLHFTLVKD
RNVATPRDYFFALAHVTRDHLVGRWIRTQQHYERDPKRIYYLSLEFYMGRTLQNTMVNLGLQ
NACDEAIYQLGLDLEEEIEEDAGLNGGGLGRLAACFLDSMATLGLAAYGYGIRYEFGIFNQKIV
NGWQVEEADDWLRYGNPWEKARPEYMLPVHFYGRVEHTPDGVKWLDTQVVLAMPYDTPV
PGYKNNTVNTMRLWSAKAPNDFKLQDFNVGDYIEAVLDRNLAENISRVLPNDNFFEGKELRL
KQEFVVAATLQDIIRRFKSSKFGCRDPVRTCFETFPDKVAIQLNDRHPALSPELMRILVDVEKV
DWDKAWAITKKTCAVTNHTVLPALERWPVSMFEKLLPRHLEIYAINQRHLDHVAALFPGDVD
RLRRMSVIEEGDCKRINMAHLCVIGSHAVNGVARIHSEIVKQSVFKDFEPEKFKQNKTNGITP
RRWLLLCNPGLADTIVEKIGEEFLDLSQLKLLPLVSDEVFIRDVAKVQENKLFSAFLEKEYKV
KINPSSMFDVHVKRIHEYKRQLLNCLHVVTLYNRIKRDPAKAFVPRVTVMIGGKAAPGYHMAKLI
KLVTSIGDVVNHDPVVGDRKLVIFLENYRVSLEAKVIPAADLSQQISTAGTEASGTGNMKFMLN
GALTIGTMDGANVEMAEAGAENLFIFGLRVEDVEALDRKGYNAREYDHLPELKQAVDQISS
GFFSPKEPDCFKDIVNMLMHDRFKVFADYEAYMQCQAQVDQLYRNPKEWTKKVIRNIACSG
KFSSDRITIEYAREIWGVPSDLQIPPNIPRD

Νουκλεοτιδική αλληλουχία *HbGP*

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATA
TGCGGAAGCCGCTGACGGACAGCGAGAAGCGGAAGCAGATCAGCGTGCGCGGCCTGGCG
GGGCTAGGCGACGTGGCCGAGGTGCGGAAGAGCTTCAACCGGCACTTGCCTTCACGCTG
GTCAAGGACCGCAATGTGGCCACGCCCCGCGACTACTTCTTCGCGCTGGCGCACACGGTGC
GCGACCACCTCGTGGCCGCTGGATCCGCACGCAGCAGCACTACTACGAGCGCGACCCCAA
GCGCATTTATTATCTTTCCCTGGAATTCTACATGGGTCGCACGCTGCAGAACACGATGGTGA
ACCTGGGCCTTCAGAATGCCTGCGATGAAGCCATCTATCAGTTGGGGTTAGACTTGGAGGA
ACTCGAGGAGATAGAAGAAGATGCTGGCCTTGGGAATGGAGGCCTGGGGAGGCTGGCAG
CGTGTTTCCTTGACTCAATGGCTACCTTGGGCCTGGCAGCATAACGGCTATGGAATCCGCTAT
GAATTTGGGATTTTAAACCAGAAGATTGTCAATGGCTGGCAGGTAGAGGAGGCCGATGACT
GGCTGCGCTACGGCAACCCCTGGGAGAAAGCGCGGCCTGAGTATATGCTTCCCGTGCCTT
CTACGGACGCGTGGAGCACACCCCGACGGCGTGAAGTGGCTGGACACACAGGTGGTGCT
GGCCATGCCCTACGACACCCCGAGTGGCCGGCTACAAGAACAACACCGTCAACACCATGCGG

CTGTGGTCCGCCAAGGCTCCCAACGACTTCAAGCTGCAGGACTTCAACGTGGGAGACTACA
TCGAGGCGGTCTTGACCGGAACTTGGCTGAGAACATCTCCAGGGTCTGTATCCAAATGA
TAACTTCTTTGAGGGGAAGGAGCTGCGGCTGAAGCAGGAGTACTTCGTGGTGGCCGCCAC
GCTCCAGGACATCATCCGCCGCTTCAAGTCGTCCAAGTTCGGCTGCCGGGACCCTGTGAGA
ACCTGTTTCGAGACGTTCCAGACAAGGTGGCCATCCAGCTGAACGACACCCACCCCGCCCT
CTCCATCCCTGAGCTCATGCGGATCCTGGTGGACGTGGAGAAGGTGGACTGGGACAAGGC
CTGGGAAATCACGAAGAAGACCTGTGCATACCAACCACACTGTGCTGCCTGAGGCCTTG
GAGCGCTGGCCCGTGTCCATGTTTGAGAAGCTGCTGCCGCGGCACCTGGAGATAATCTATG
CCATCAACCAGCGGCACCTGGACCACGTGGCCGCGCTGTTTCCCGGCGATGTGGACCGCCT
GCGCAGGATGTCTGTGATCGAGGAGGGGGACTGCAAGCGGATCAACATGGCCACCTGTG
TGTGATTGGGTCCCATGCTGTCAATGGTGTGGCGAGGATCCACTCGGAGATCGTGAAACAG
TCGGTCTTTAAGGATTTTTATGAACTGGAGCCAGAGAAGTTCAGAATAAGACCAATGGCA
TCACCCCGCCGGTGGCTGCTGCTGTGCAACCCGGGGCTGGCCGATACCATCGTGGAGAA
AATTGGGGAGGAGTTCCTGACTGACCTGAGCCAGCTGAAGAAGCTGCTGCCGCTGGTCAGT
GACGAGGTGTTTCATCAGGGACGTGGCCAAGGTCAAACAGGAGAACAAGCTCAAGTTCTCG
GCCTTCTGGAGAAGGAGTACAAGGTGAAGATCAACCCCTCCTCCATGTTTCGATGTGCATG
TGAAGAGGATCCACGAGTACAAGCGGCAGCTGCTCAACTGCCTGCACGTCGTCACCCTGTA
CAATCGAATCAAGAGAGACCCGGCCAAGGCTTTTTGTGCCAGGACTGTTATGATTGGGGGC
AAGGCAGCGCCCGTTACCACATGGCCAAGCTGATCATCAAGTTGGTCACCTCCATCGGCG
ACGTCGTCATCATGACCCAGTTGTGGGTGACAGGTTGAAAGTGATCTTCCTGGAGAACTA
CCGTGTGTCCTTGGCTGAGAAAGTGATCCCGGCCGCTGATCTGTGCGCAGCAGATCTCCACTG
CAGGCACCGAGGCCTCAGGCACAGGCAACATGAAGTTCATGCTCAACGGGGCCCTCACCAT
CGGCACCATGGACGGCGCCAACGTGGAGATGGCCGAGGAGGCCGGGGCCGAGAACCTCTT
CATCTTCGGCCTGCGGGTGGAGGATGTCGAGGCCTTGGACCGGAAAGGGTACAATGCCAG
GGAGTACTACGACCACCTGCCCCGAGCTGAAGCAGGCCGTGGACCAGATCAGCAGTGGCTTT
TTTTCTCCAAGGAGCCAGACTGCTTCAAGGACATCGTGAACATGCTGATGCACCATGACAG
GTTCAAGGTGTTTGCAGACTATGAAGCCTACATGCAGTGCCAGGCACAGGTGGACCAGCTG
TACCGGAACCCCAAGGAGTGGACCAAGAAGGTCATCAGGAACATCGCCTGCTCGGGCAAG
TTCTCCAGTGACCGGACCATCACGGAGTATGCACGGGAGATCTGGGGTGTGGAGCCCTCCG
ACCTGCAGATCCCGCCCCCAACATCCCCCGGGACTAG